UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE
HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

ANNÉE 1972-1973

Série E N° 264

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Cinja BARK

Titre de la thèse

Contribution à l'étude de la tréhalase sérique et urinaire de l'homme

---

Soutenue le 1973

JURY :

M. J.-E. COURTOIS — Président
M. F. PERCHERON — Examinateurs
M. F. ROUSSELET — Examinateurs

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE
HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

ANNÉE 1972-1973 Série E N° 264

THÈSE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Cinja BARK

Titre de la thèse

Contribution à l'étude de la tréhalase sérique et urinaire de l'homme

---

Soutenue le

JURY :

M. J.-E. COURTOIS — Président
M. F. PERCHERON — Examinateurs
M. F. ROUSSELET — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Officier de la Légion d'Honneur,

Inspecteur Général des Pharmacies de l'Assistance Publique,

Qui après nous avoir conseillée et guidée tout au long de ce travail, nous a fait l'honneur de présider notre jury,

En témoignage de notre profonde gratitude et de notre profond attachement.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes,

Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,

En témoignage de notre respectueuse gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548009_0020

A Monsieur le Professeur F. ROUSSELET,

Professeur en Biochimie Appliquée à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René Descartes,

Qui a bien voulu accepter de juger ce travail,

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A Mademoiselle J. LABAT et Monsieur J.F. DEMELLER,

Avec notre amitié.

I N T R O D U C T I O N

_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_

Une tréhalase fut décelée en 1962 dans le rein de Porc par DEBRIS, COURTOIS et PETEK (29).

Ceci incita le Professeur J.E. COURTOIS à entreprendre avec ses collaborateurs l'étude systématique des tréhalases des Mammifères.

Poursuivant les travaux entrepris par GEORGET (43), DEMELIER (30), LABAT (55) et MASSARI (61), nous avons été amenée à approfondir l'étude de la tréhalase que l'on retrouve régulièrement dans le sérum et l'urine de l'Homme.

Nous avons notamment précisé la cinétique enzymatique de la réaction d'hydrolyse et mis au point un protocole de dosage reproductible et d'exécution facile.

Nous avons alors étudié de façon statistique l'activité tréhalasique sérique et urinaire en fonction du sexe, du rythme circadien, du groupe sanguin et de la race. Nous avons également suivi son comportement au cours de l'effort. Nous avons aussi cherché à différencier les diverses tréhalases de Mammifères par le biais de l'étude de certains effecteurs. Au cours de travaux antérieurs, DEMELIER (30), LABAT et coll (55) ont pu montrer l'influence de dihydrochalcones sur le comportement des tréhalases rénales de l'Homme et du Porc et de la Tréhalase de l'intestin grêle du Porc.

Ces tréhalases se différencient ainsi de tréhalases d'origine différente comme les tréhalases du Hanneton (45) et

de Pseudomonas fluorescens (46) par exemple.

Avant de passer à l'exposé de nos résultats, nous tenons à exprimer notre plus sincère reconnaissance et notre plus respectueuse admiration à notre Maître, Monsieur le Professeur Jean-Emile COURTOIS, qui nous a prodigué ses conseils inestimables et nous a enrichi de sa grande expérience, nous permettant ainsi d'achever ce travail dans d'excellentes conditions.

Nous exprimons nos respectueux remerciements au Professeur F. PERCHERON, qui a bien voulu accepter de juger notre travail.

Nous voudrions aussi remercier le Professeur F. ROUSSELET, qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

Nous désirons exprimer notre profonde gratitude à Mademoiselle Jacqueline LABAT, Chargée de Recherches au C.N.R.S. et Monsieur Jean-François DEMELIER, Chef du Laboratoire de Biochimie à l'Hôpital Laënnec. Ils nous ont initiée à la recherche, nous suivant pas à pas tout au long de l'exécution de ce travail, avec une inlassable patience ; leurs conseils éclairés nous ont remarquablement facilité la poursuite de nos recherches puis la rédaction finale.

- o -

P R E M I E R E P A R T I E

_°_°_°_°_°_°_°_°_°_°_°_°_°_°_

GENERALITES

Chapitre I - REPARTITION ET PRINCIPAUX CARACTERES DES TREHALASES

Découverte en 1893 par BOURQUELOT (9) dans une moisissure, l'Aspergillus niger, la tréhalase hydrolyse le tréhalose en deux molécules de glucose. Cette enzyme appartient aux glycoside-hydrolases ; c'est l'$\alpha\,\alpha'$ - Glucoside 1-gluco-hydrolase avec l'indice numérique 3.2.1.28, dans la classification des enzymes adoptée par l'Union Internationale de Biochimie.

La tréhalase a une spécificité extrêmement limitée et ne parait pouvoir hydrolyser qu'un seul substrat naturel : le tréhalose.

Tout récemment, cependant, E. GUILLOUX et Coll. (46) (48), J. LABAT et Coll. (recherches non publiées) ont constaté que le monodésoxy 6 tréhalose pouvait être hydrolysé par les tréhalases de Hanneton, de Pseudomonas et de rein de Porc.

La tréhalase purifiée a un comportement nettement distinct de celui des autres disaccharidases.

a) Elle n'est pas inhibée par le glucose ; ceci a été observé avec des tréhalases purifiées d'origines les plus variées : levure, insectes, rein, sérum. Par ailleurs, l'acide

gluconique n'inhibe pas les tréhalases purifiées.

b) Il n'a pas été observé d'action transosylante avec les enzymes d'intestin de Porc (27), levure, graines de Plantago, Hanneton (24), Sauterelle Melanoplus differencialis (3 Pseudomonas (1).

Au cours de l'hydrolyse, le seul corps qui apparait est le glucose ; l'on n'observe pas la formation de di et tri saccharides nouveaux comme on l'observe avec le maltose, le lactose, le saccharose et les disaccharidases correspondantes.

L'eau parait être le seul accepteur lors de l'action de la tréhalase.

c) L'enzyme de Hanneton mise en contact avec une solution concentrée de glucose, [GUILLOUX (47)] n'a provoqué aucune biosynthèse d' α glucoside.

Les comportements a, b, c, ne représentent que des aspects différents de l'absence de liaison entre la tréhalase et le glucose. Tout se passe comme si, dès leur production par l'action de l'enzyme, les deux groupements α glucopyranosyl séparés quittaient immédiatement l'enzyme qui ne les retient pas. Ces groupements ne peuvent ainsi se lier à un accepteur pour une transglucosylation.

A la différence d'autres glycosidases, la tréhalase n'est pas inhibée par de fortes concentrations en substrat.

Les tréhalases sont des enzymes très largement répandues, peut-être même plus que le tréhalose (16). Elles ont été caractérisées dans un grand nombre d'espèces.

T A B L E A U N° I

Groupes de la classification où la tréhalase a été signalée dans de nombreuses espèces

Bactéries	Mollusques
Champignons	Crustacés
Ptéridophytes	Insectes
Phanérogammes	Poissons
Protozoaires	Reptiles
	Oiseaux
	Mammifères

Divers pollens (49), dépourvus de tréhalose, contiennent de la tréhalase ; ils germent bien dans l'eau avec le tréhalose comme seule substance carbonée.

Le pollen métabolise le tréhalose pour la croissance du tube pollinique.

T A B L E A U N ° II

Activité tréhalasique de divers tissus et organes de l'Homme (COURTOIS et DEMELIER) (19)

Foie	20 *	Absence dans : cerveau, cervelet, sous-maxillaire, surrénales, muscle squelettique, myocarde, pancréas, poumon, prostate, thymus, hématies, leucocytes.
Bile	25	
Intestin	35 **	
Rein	1250	
Sérum	25	
Urine	0,6	

* Les chiffres du tableau correspondent aux Unités Tréhalasiques : micromolécules de tréhalose hydrolysées par minute à pH 5,7 et 37° par Kg d'organe frais.

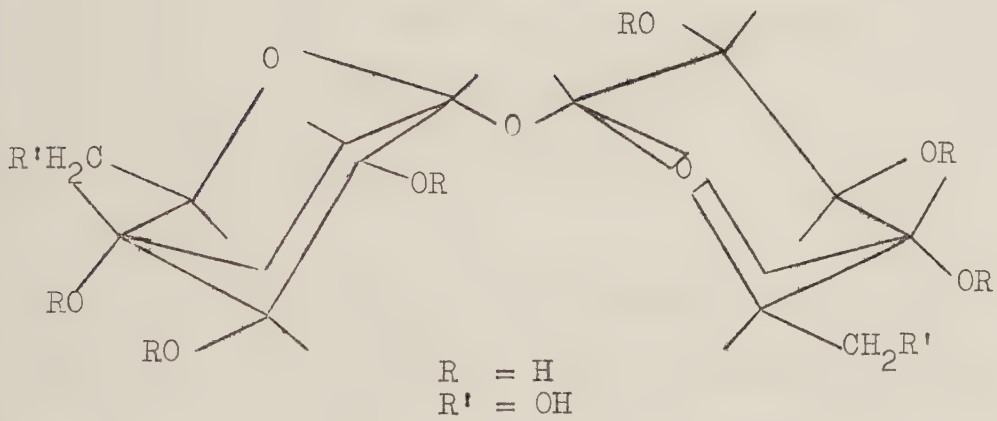
** L'activité tréhalasique intestinale déterminée sur des prélèvements biopsiques est exprimée en U. Tr. par gramme de protéines dans l'homogénat.

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur formé par l'association de deux molécules de D-glucose liées par leurs groupes réducteurs.

Avec le glucose sous forme pyranosidique, l'on peut concevoir l'existence de trois formes isomères : α-α', α-β et β-β'. Les trois ont été obtenues par synthèse ; jusqu'ici, seule la forme à deux liaisons α a été signalée chez les Êtres vivants.

Le tréhalose occupe une position typique parmi les accharides naturels car ses deux unités glucopyranosyl sont ossibles à distinguer l'une de l'autre par les méthodes siques ou chimiques (BIRCH et RICHARDSON) (7).

Figure n° 1



R = H
R' = OH

α D glucopyranosyl (1-1') α D glucopyranoside

Formule du tréhalose

Le tréhalose fut obtenu cristallisé pour la première s à partir des coques de Tréhala ; elles avaient été, très isemblablement, récoltées en Iran.

Le tréhalose est le disaccharide naturel le plus ndamment distribué dans les diverses familles de Micro- anismes ; Végétaux et Animaux.

T A B L E A U N ° III

Groupe de la classification où le tréhalose a été signalé dans de nombreuses espèces

Bactéries	Protozoaires
Champignons	Plathelminthes
Lichens	Némathelminthes
Algues	Acantocéphales
Selaginellacées	Annélides
	Mollusques
	Insectes

Le tréhalose a été détecté dans le suc cambial du Hêtre (67). Il demeure une substance très rare et peu abondante chez les Phanérogames.

Cependant, une activité tréhalasique a été observée dans de nombreuses plantes.

Le tréhalose se présente comme la principale source de glucose (92) (93) facilement accessible pour fournir à l'insecte l'énergie dont il a besoin lors du vol (13).

Chez les Mammifères, ce n'est que récemment que SACKTOR et BERGER (77) ont réussi à le synthétiser pour la première fois en incubant des tranches de rein de Lapin avec du glucose marqué pendant un laps de temps très court.

- ° -

hapitre II - MATERIEL ET METHODES

L'activité tréhalasique est exprimée en Unité réhalasique (U. Tr.) ou nombre de micromoles de tréhalose ydrolysé en une minute par un litre de liquide biologique à H 5,7 à 37°.

Le nombre de micromoles de tréhalose hydrolysé est valué par l'intermédiaire du glucose libéré dans le milieu. Ce lucose peut être dosé par différentes techniques.

1°) - Dosage du glucose libéré lors de l'hydrolyse du tréhalose par la méthode à l'o.toluidine

Principe

La méthode est basée sur la réaction colorée que onnent les aldoses avec l'o.toluidine dans l'acide acétique lacial (52).

Nous avons retenu la technique préconisée par YYVÄRINEN et NIKKILÄ (53) et l'avons adaptée à nos besoins, our doser le glucose libéré par l'enzyme. Il s'agit d'une éthode rapide, précise et facile à réaliser.

Réactif

o.toluidine ..... 60 ml

Thiourée ..... 1,5 g

Acide acétique glacial q.s.p. .....1000 ml

Le réactif doit être pratiquement incolore et il faut le conserver dans un flacon coloré à l'abri de la lumière, de l'humidité, des métaux et du caoutchouc.

Il peut être conservé ainsi pendant deux mois, envir

La thiourée ajoutée au réactif stabilise celui-ci et entraine une absorption pratiquement nulle du témoin. On obtien ainsi une coloration bleu-vert en présence de glucose.

Technique

Dans chaque tube, nous introduisons 4,5 ml de réacti et 0,5 ml de la solution de glucose à doser. Après avoir mélang nous plaçons les tubes bouchés avec du coton cardé dans un bain-marie bouillant pendant 8 minutes. Nous laissons refroidir sous eau courante et mesurons l'intensité de la coloration bleu-vert au spectrophotomètre JOBIN et YVON, "Type Maroc" à 630 nm en cuve de 1 cm. La lecture est effectuée contre une solution témo préparée dans les mêmes conditions, renfermant 4,5 ml de réacti et 0,5 ml d'eau distillée. Les chiffres obtenus sont comparés à ceux d'une gamme étalon de glucose contenant de 100 à 500 µg d glucose. La stabilité de la couleur est satisfaisante. Pour PAOLAGGI (70), la coloration obtenue suit parfaitement la loi

de Beer-Lambert et reste suffisamment stable pour permettre une lecture aisée : en 5 heures, on note cependant une baisse de 20 % de l'intensité de la coloration. La spécificité de cette technique est limitée. Il a été vérifié, par réalisation parallèle d'un témoin, que le tréhalose n'interfère pas lors du dosage. Ce disaccharide, difficilement hydrolysable par les acides (68) (82), ne libère pas de glucose dans nos conditions opératoires.

Une interprétation de ce phénomène a été proposée par EDWARD (38) pour lequel l'atome d'O de la liaison glycosidique serait protégé par les atomes d'H axiaux des deux cycles pyraniques. Avant l'hydrolyse, devrait intervenir une inversion dans la conformation de la molécule.

Cependant, avec d'autres diholosides, les interférences dans le dosage sont importantes. Pour PAOLAGGI (70) le saccharose, par exemple, produit une interférence de 31 %. C'est pourquoi nous avons adopté la technique de NELSON-SOMOGYI lors des dosages en présence d'effecteurs.

2°) - Dosage du glucose par la méthode de NELSON-SOMOGYI

Ce protocole de dosage a été retenu lors des essais relatifs aux inhibiteurs de la tréhalase (ex. : saccharose) dont l'hydrolyse en milieu acide est plus rapide que celle du tréhalose.

Principe

Le dosage est effectué en deux étapes :

- Le réactif cupro-alcalin de SOMOGYI (83) est réduit à l'ébullition par l'hexose. Ce réactif est fortement chargé en sulfate de sodium qui empêche la réoxydation de l'oxyde cuivreux formé.

- L'oxyde cuivreux réduit ensuite le réactif arséniat molybdique de NELSON (65) en donnant une coloration bleue due à des dérivés molybdeux.

Réactifs

- Solution cupro-alcaline de SOMOGYI :

. phosphate disodique à $12H_2O$ 70,5

. tartrate neutre de potassium et de sodium .. 40 g

. eau distillée 350

Dissoudre ces deux sels, puis ajouter en agitant et dans l'ordre :

. soude solution N/1 100

. solution de sulfate de cuivre $5H_2O$ à 10 % ... 80

. sulfate de sodium anhydre 80

. eau distillée q.s.p. 100

Boucher et maintenir 48 heures à l'étuve à 37°, puis filtrer. Cette solution est conservée à l'obscurité en flacon de polythène.

- Réactif arséniato-molybdique de NELSON :

. molybdate d'ammonium ..... 25 g

Dissoudre dans 400 ml d'eau distillée en chauffant légèrement ;

ajouter ensuite, dans l'ordre :

. acide sulfurique pur ..... 21 ml

. arséniate disodique à 7 H_2O .... 3 g

Laisser 48 heures en flacon bouché à 37° ; si la teinte est verdâtre, ajouter quelques gouttes d'une solution de permanganate de potassium 0,05 N jusqu'à obtention d'une coloration jaune d'or. Conserver à l'abri de la lumière en flacon de verre brun.

Technique

Le glucose préexistant dans le sérum et le glucose libéré par l'hydrolyse enzymatique sont dosés par la semi-microméthode de NELSON et SOMOGYI. Les protéines sériques sont éliminées au préalable par défécation à l'aide de ferrocyanure de potassium et de sulfate de zinc selon PAGET (69).

Dosage du glucose libéré

Réactifs	A Activité enzymatique	B témoin sérum	C témo réact
Défécation			
Dans les tubes provenant de l'hydrolyse enzymatique et contenant 2,5 ml de mélange, on ajoute :			
- solution de ferrocyanure de potassium (172 g/l)	0,25 ml	0,25 ml	
- solution acide acétique(50g/l)	0,4 ml	0,4 ml	
- solution de sulfate de zinc (175 g/l)	0,25 ml	0,25 ml	
- eau distillée	1,6 ml	1,6 ml	

Agiter, puis filtrer sur filtre sans cendre.

Réduction			
Dans les tubes de pyrex jaugés à 25 ml, on mesure :			
- eau distillée			1 m
- filtrat de défécation	1 ml +	1 ml	
- carbonate acide de potassium 1%	1 ml	1 ml	1 m
- liqueur cupro-alcaline	2 ml	2 ml	2 m

Plonger les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Refroidir dans la glace, puis ajouter :

- Réactif arséniato-molybdique	1 ml	1 ml	1

Maintenir 5 minutes à la température du laboratoi puis compléter à 25 ml avec de l'eau distillée. Lire au phot colorimètre à 700 nm le contenu des tubes contre le témoin r

+ Dans le cas où le pouvoir réducteur du tube A est trop imp tant, on réduit à 0,5 ml ou 0,25 ml le volume du filtrat : on ajoute alors un volume égal de solution de carbonate acide de potassium et on complète à 2 ml avec de l'eau dis tillée.

L'appareil utilisé, un photocolorimètre tricellulaire de Jobin et Yvon, a été préalablement étalonné avec une solution de glucose à 100 µg par ml, la mesure de la densité optique se faisant comme pour les essais, contre le témoin Réactifs (tube C), avec l'écran 70.

La courbe d'étalonnage obtenue est linéaire jusqu'à 200 µg de glucose par ml.

3°) - Dosage de la créatinine urinaire

Principe

La créatinine a été dosée à l'autoanalyseur Technicon selon le schéma ci-dessous (p. 16) d'après une modification de la réaction de JAFFE dont le principe est le suivant :

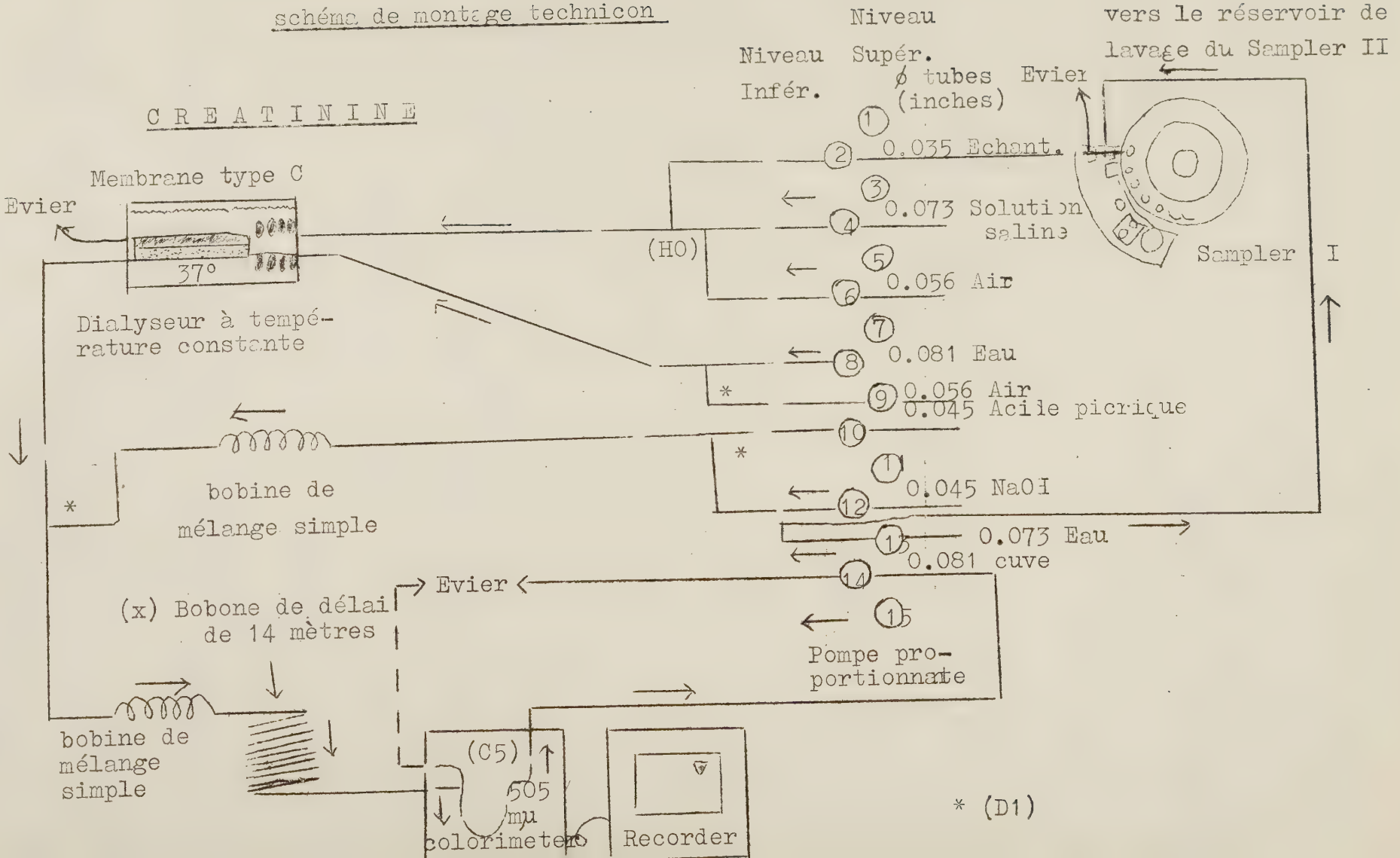
La créatinine $C_4H_7N_3O$, anhydre de la créatine $C_4H_9N_3O_2$ donne en solution aqueuse, en présence d'acide picrique et de soude, une coloration rouge type bichromate intense qui permet son dosage colorimétrique.

Réactifs

- Solution de chlorure de sodium à 9 °/₀₀
- Hydroxyde de sodium 0,5 N
- Solution d'acide picrique à saturation
- Solution étalon mère de créatinine (1 mg de créatinine par ml).

Figure N° 2

schéma de montage technicon



4°) - Protéines urinaires (DENIS et AYER) (36)

Principe

Les protéines sont précipitées par l'acide sulfosalicylique.

Réactifs

- Solution d'acide sulfosalicylique à 3 %
- Solution de NaCl à 9°/$_{oo}$

Technique

1 ml d'urine est mélangé à 3 ml de solution d'acide sulfosalicylique. Après 10 minutes de repos, le trouble obtenu est lu à 650 nm contre un blanc contenant 4 ml de solution de NaCl à 9 °/$_{oo}$. Dans le cas où les urines contiennent une forte teneur en protéines, elles sont diluées avec la solution de NaCl à 9 °/$_{oo}$. La solution étalon est réalisée avec du Versatol (sérum étalon lyophilisé et standardisé). 1 ml de Versatol est dilué au 1/50 e. Cette solution est ensuite diluée au 1/1,5, 1/2, 1/3, 1/4, 1/8.

5°) - Calculs statistiques (42)

Nous avons calculé les moyennes arithmétiques et

logarithmiques, l'écart type 6 et l'écart standard de la moyenne ($Sm = \frac{6}{\sqrt{n-1}}$).

- En effet, la moyenne ne renseigne en rien sur la façon dont les différentes valeurs de cette distribution se groupent plus ou moins étroitement autour de cette moyenne. Il est donc nécessaire d'associer aux indications fournies par la moyenne, un indice qui renseigne sur cette "dispersion" des valeurs individuelles autour de la moyenne.

- Variance : Il s'agit donc de caractériser de façon globale l'écart plus ou moins important de l'ensemble des valeurs de la distribution par rapport à la valeur moyenne Si $\bar{x}$ est la moyenne, l'écart d'une valeur individuelle x à la moyenne est $(x - \bar{x})$. Mais, de ces écarts, les uns sont positi les autres sont négatifs. Pour que ce signe n'intervienne pas, on envisage les carrés des écarts $(x - \bar{x})^2$. La somme de ces carrés $\sum (x - \bar{x})^2$ appelés "écarts quadratiques" donne une idée de la dispersion globale des valeurs de la distribution rapport à leur valeur moyenne.

On est ainsi amené à définir la "variance" ou "dispersion" ou "fluctuation", symbolisée par 6^2, comme la somme, divisé par leur nombre, des carrés des écarts :

$$6^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n} .$$

La variance n'est pas autre chose que la moyenne arithmétique des carrés des écarts. Elle donne donc un indice "moyen" de la dispersion globale de la distribution, comme la moyenne donnait un indice "moyen" de l'ordre de grandeur de l distribution.

Si le nombre d'échantillons est inférieur à 100, l

calculs montrent qu'il est préférable de prendre comme quotient non pas le nombre n, mais le nombre (n - 1) dit nombre de degrés de liberté. L'expression de la variance devient alors :

$$6^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} .$$

- Ecart type : La variance est un carré. Afin d'avoir un indice de même équation dimensionnelle que la variable, on est amené à considérer la racine carrée de la variance, qui est homogène avec x et qui constitue l'écart type 6, appelé "écart quadratique moyen" : $6 = \sqrt{6^2} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$ ou $6 = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$.

L'écart type indique bien la dispersion plus ou moins grande des mesures autour de leur moyenne : plus l'écart type est faible en effet, plus les valeurs sont "resserrées" autour de leur moyenne, et inversement bien entendu, plus l'écart type est important, plus la distribution est étalée.

- Détermination de l'intervalle de confiance d'une moyenne $Sm = \frac{6}{\sqrt{n - 1}}$. Sm : l'écart standard de la moyenne. On pourra exprimer l'intervalle de confiance de la moyenne qui sera $m \pm 2$ Sm au coefficient de sécurité de 95 % et $m \pm 2{,}6$ Sm au coefficient de sécurité de 99 %.

Dans notre cas, tous les calculs ont été faits à partir des données logarithmiques ; nos résultats se répartissent en effet selon des distributions log normales.

- ° -

D E U X I E M E P A R T I E

_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_

ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES TREHALASES DU SERUM ET DE L'URINE DE L'HOMME

Chapitre I - ETUDE DE LA CINETIQUE DE LA REACTION

A) - Tréhalase sérique

1°) - Détermination du pH optimum

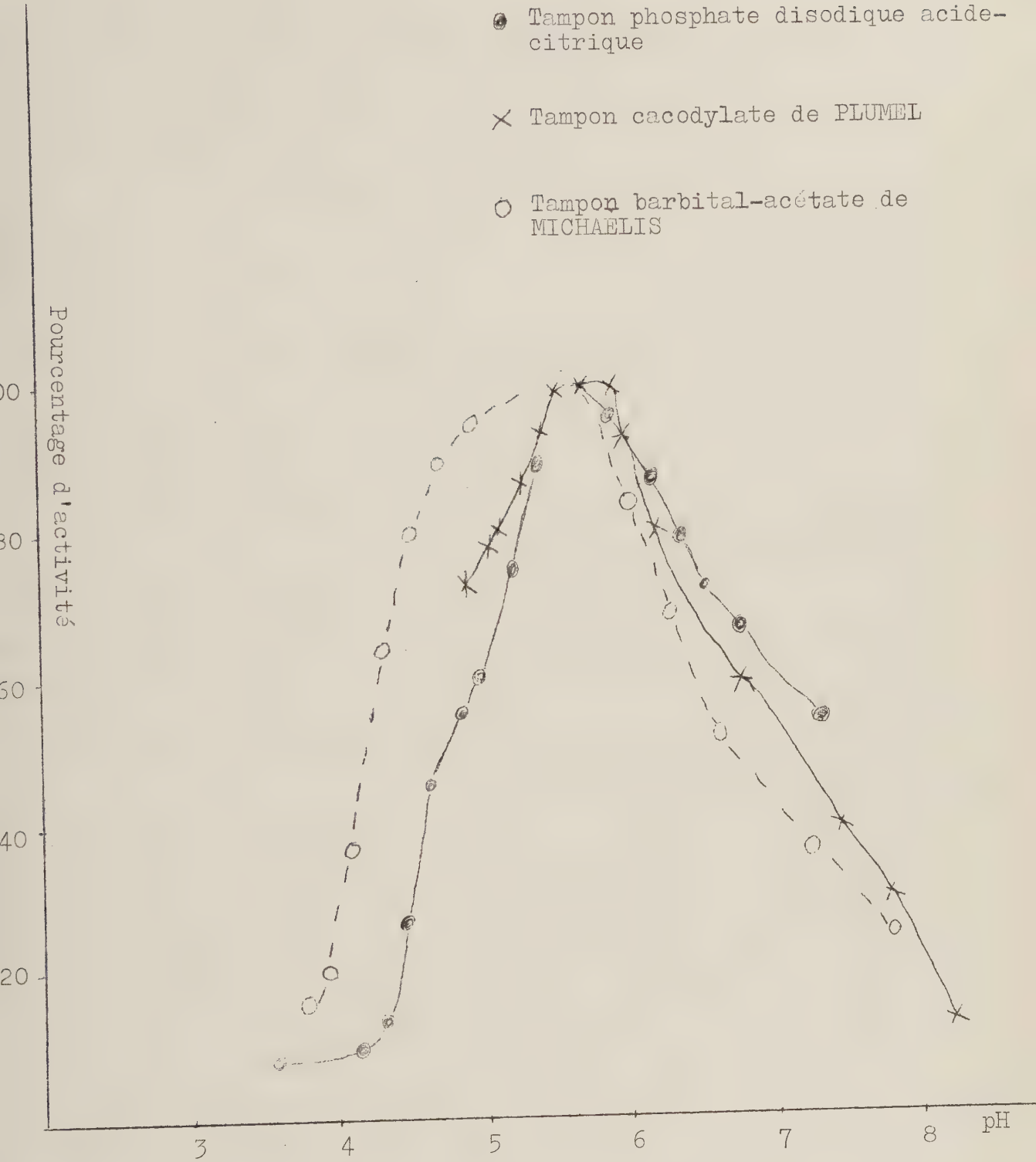
Nos essais ont été effectués sur des mélanges de sérums ou de plasmas en présence de différents tampons à base de sels de sodium : tampons de MAC ILVAINE (59), de MICHAELIS (62) et de PLUMEL (72).

Les zones des pH couvertes par ces solutions tampon vont de 3,6 à 7,3 pour le tampon phosphate disodique-acide citrique de MAC ILVAINE, de 3,8 à 7,8 pour le tampon barbital-acétate de MICHAELIS et de 4,9 à 8,2 pour le tampon cacodylate de PLUMEL. La concentration en tréhalose du milieu était M/30. Les résultats que nous avons obtenus lors de nos expériences font l'objet de la figure n°. 3 sur laquelle nous avons porté en abcisses les pH et en ordonnées les pourcentages d'activité tréhalasique.

Quel que soit le tampon utilisé, la courbe de pH optimum de l'enzyme présente le même aspect.

Figure nº 3

pH optimum de la tréhalase sérique



Le maximum d'activité se situe entre 5,5 et 5,9. Dan tous les cas, l'activité croît lentement dans la zone des pH acides et décroît très rapidement du côté des pH alcalins.

Nous avons effectué les mêmes essais sur le sérum d'un sujet hypertréhalasémique, afin de savoir si l'hyperactivi provient de la même enzyme ou d'une enzyme différente.

Nous avons trouvé le même pH optimum qu'avec les autres sérums, avec un seul maximum situé à pH 5,7.

2°) - Inactivation thermique

Nous avons étudié la dénaturation thermique en dosan l'activité résiduelle après chauffage à des températures croissantes pendant un temps déterminé.

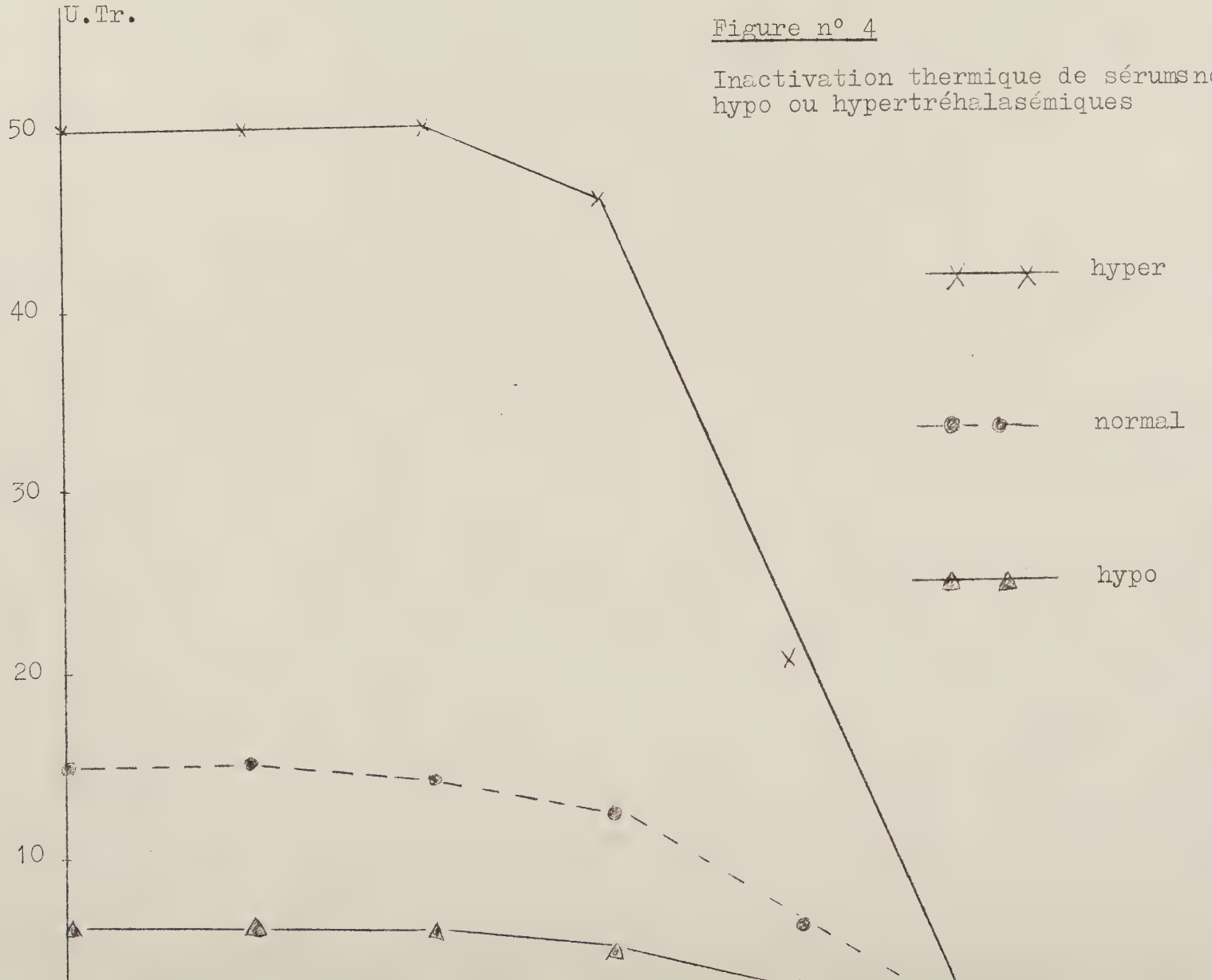
Des tubes contenant un mélange de sérums sont portés à la température correspondant à l'essai d'inactivation choisi (40°, 45°, 50°, 55°, 60°) pendant 10 minutes. Après refroidissement, nous procédons immédiatement à la détermination de l'activité tréhalasique à 37°.

La moyenne de l'activité résiduelle nous a permis de mettre en évidence une inactivation légère de l'enzyme dès 50°. Cette inactivation thermique va en s'accroissant pour des températures plus élevées. Elle est pratiquement totale pour un chauffage à 60° pendant 10 minutes.

Quel que soit le taux de l'activité tréhalasique, la courbe de l'inactivation thermique de l'enzyme présente la même allure (figure 4).

Figure n° 4

Inactivation thermique de sérums normaux, hypo ou hypertréhalasémiques



3°) - Détermination de la constante de MICHAELIS

Principe

Avec une concentration optimale en préparation enzymatique, établie par des expériences préliminaires, on mesure la vitesse de réaction en présence de concentrations variables de substrat.

La détermination de l'affinité de la tréhalase pour le tréhalose a été effectuée à pH 5,7 et à 37°, en faisant varier la concentration du tréhalose de M/20 à M/320 dans le milieu. La réaction d'hydrolyse suit la loi classique de MICHAELIS (63). On peut ainsi établir le nombre de micromolécules de glucose libéré par l'hydrolyse du tréhalose en une minute, ce qui donne les vitesses de réaction. Nous avons tracé la courbe $V = f(S)$ en portant en ordonnées les vitesses de réaction et en abscisses les concentrations milli-molaires en substrat (figure 5). - 52 -

Nous avons constaté que la vitesse de réaction augmente avec la concentration en tréhalose et tend vers un maximum quand l'enzyme se trouve saturée par le tréhalose (M/30 dans le milieu).

Nous avons évalué cette vitesse maximale (Vm) dont nous avons déduit une valeur approximative de Km (Km = 2,6 à 3 x 10^{-3} M).

Nous avons utilisé les mêmes résultats pour calculer $\frac{1}{V}$ et $\frac{1}{S}$ et tracé la courbe selon la méthode graphique de LINEWEAVER et BURK (57) en portant en ordonnées $\frac{1}{V}$ et en abscisses $\frac{1}{S}$. Nous en avons déduit le Km et Vm de la tréhalase

dans les conditions de l'expérience (Figure 6). Nous avons effectué la détermination de la constante de MICHAELIS (Km) sur 19 sérums différents et nous avons déterminé parallèlement l'activité tréhalasique de ces sérums. Nos résultats sont réunis dans le tableau IV.

T A B L E A U N ° IV

Détermination de la constante de MICHAELIS des tréhalases sériques par les méthodes de LINEWEAVER et BURK

N°	Activité tréhalasique (U. Tr.)	Constante de Michaelis (Km)	N°	Activité tréhalasique (U. Tr.)	Constante de Michaelis (Km)
1	5	$3,0 \times 10^{-3}$	11	16	$2,0 \times 10^{-3}$
2	7	$1,8 \times 10^{-3}$	12	17	$2,3 \times 10^{-3}$
3	8	$1,7 \times 10^{-3}$	13	22	$2,5 \times 10^{-3}$
4	8	$2,2 \times 10^{-3}$	14	24	$1,7 \times 10^{-3}$
5	9	$2,3 \times 10^{-3}$	15	29	$1,9 \times 10^{-3}$
6	10	$2,5 \times 10^{-3}$	16	31	$2,6 \times 10^{-3}$
7	12	$2,5 \times 10^{-3}$	17	32	$2,5 \times 10^{-3}$
8	13	$2,0 \times 10^{-3}$	18	41	$2,3 \times 10^{-3}$
9	13	$1,7 \times 10^{-3}$	19	84	$3,0 \times 10^{-3}$
0	13	$2,0 \times 10^{-3}$			

Les valeurs obtenues pour les Km sont assez peu dispersées, l'écart type étant de 0,43 et l'écart standard à la moyenne de 0,101. Elles sont d'autre part, indépendantes des valeurs de l'activité tréhalasique pour un même sérum. Il semble permis d'en déduire qu'il n'existe pas d'inhibiteur compétitif dans les sérums à faible activité, ni d'activateur dans les sérums à forte activité.

Ces valeurs sont, d'autre part, du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les tréhalases rénale et intestinale de Porc, respectivement 5,4 x 10^{-3} M et 5 x 10^{-3}M, et la tréhalase rénale de l'Homme (3 x 10^{-3} M) (30) (55).

Toujours à partir des mêmes résultats expérimentaux, nous avons construit la représentation graphique de $V = \int (\frac{V}{S})$ selon AUGUSTINSSON (2).

Cette représentation permet, d'après HOFSTEE (51), de mettre en évidence dans la même préparation, la présence de deux enzymes hydrolysant simultanément le même substrat.

Les résultats obtenus semblent montrer qu'il n'existe qu'une enzyme hydrolysant le tréhalose dans les sérums que nous avons étudiés (figure 7).

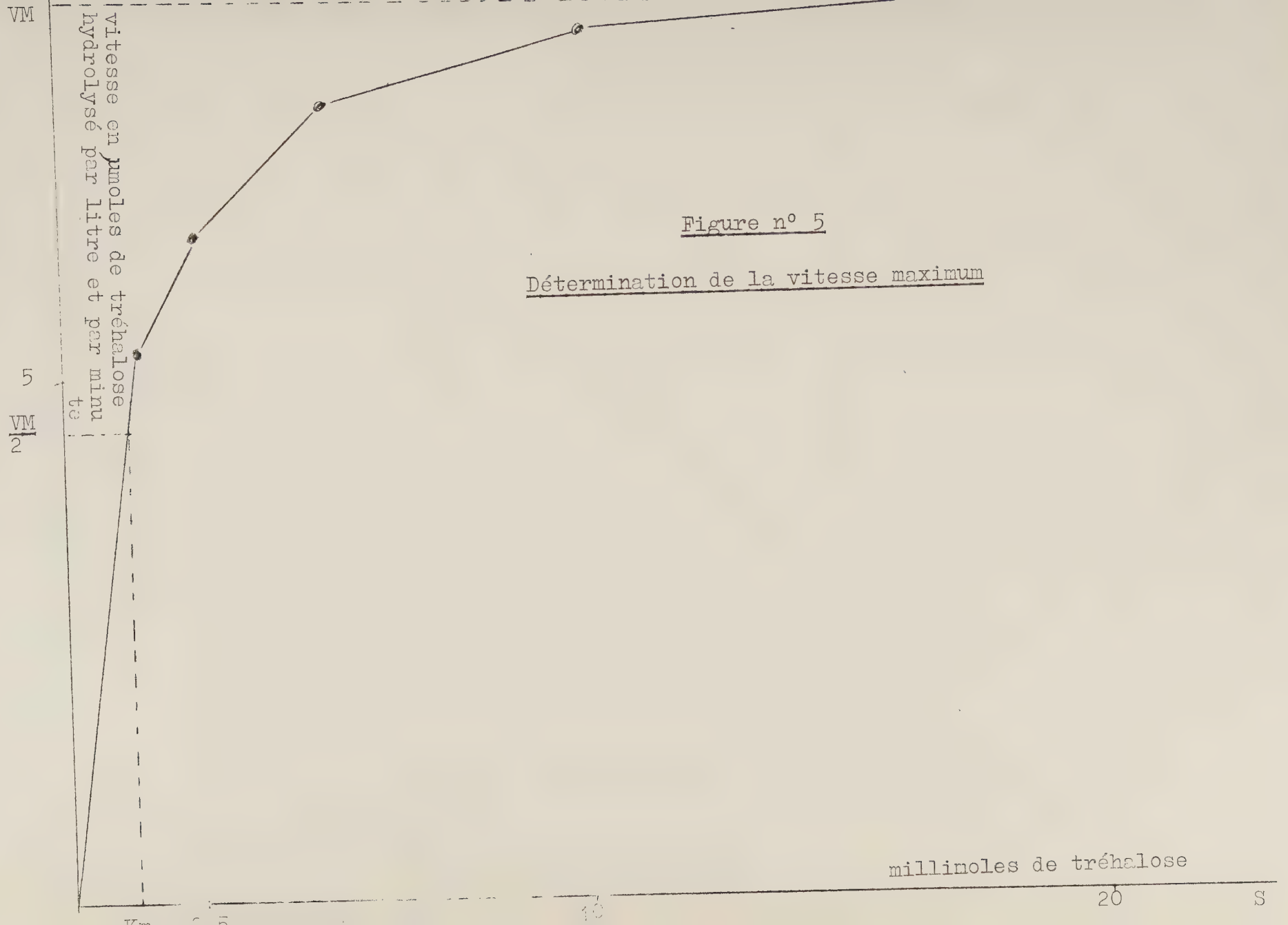


Figure n° 5

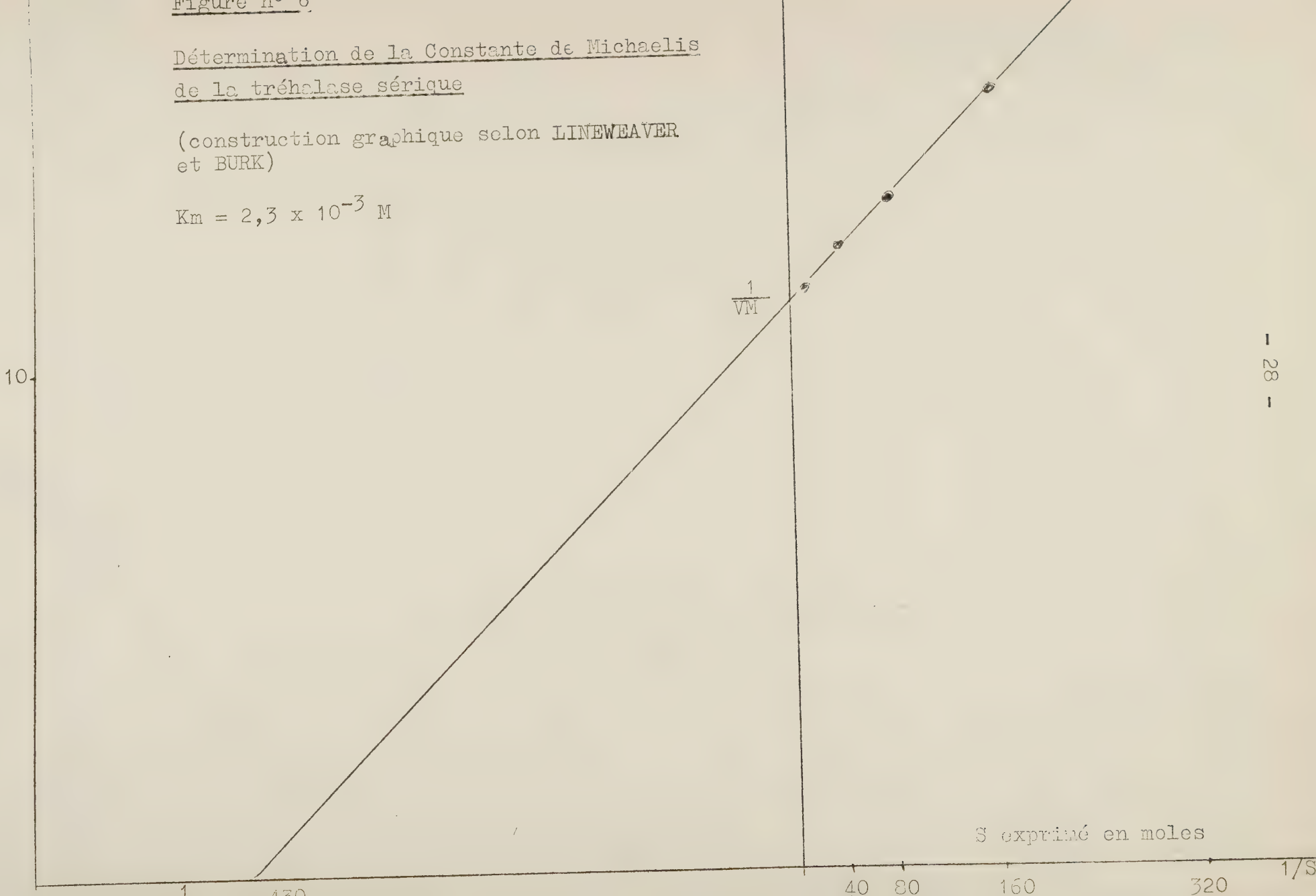
Détermination de la vitesse maximum

Figure n° 6

Détermination de la Constante de Michaelis de la tréhalase sérique

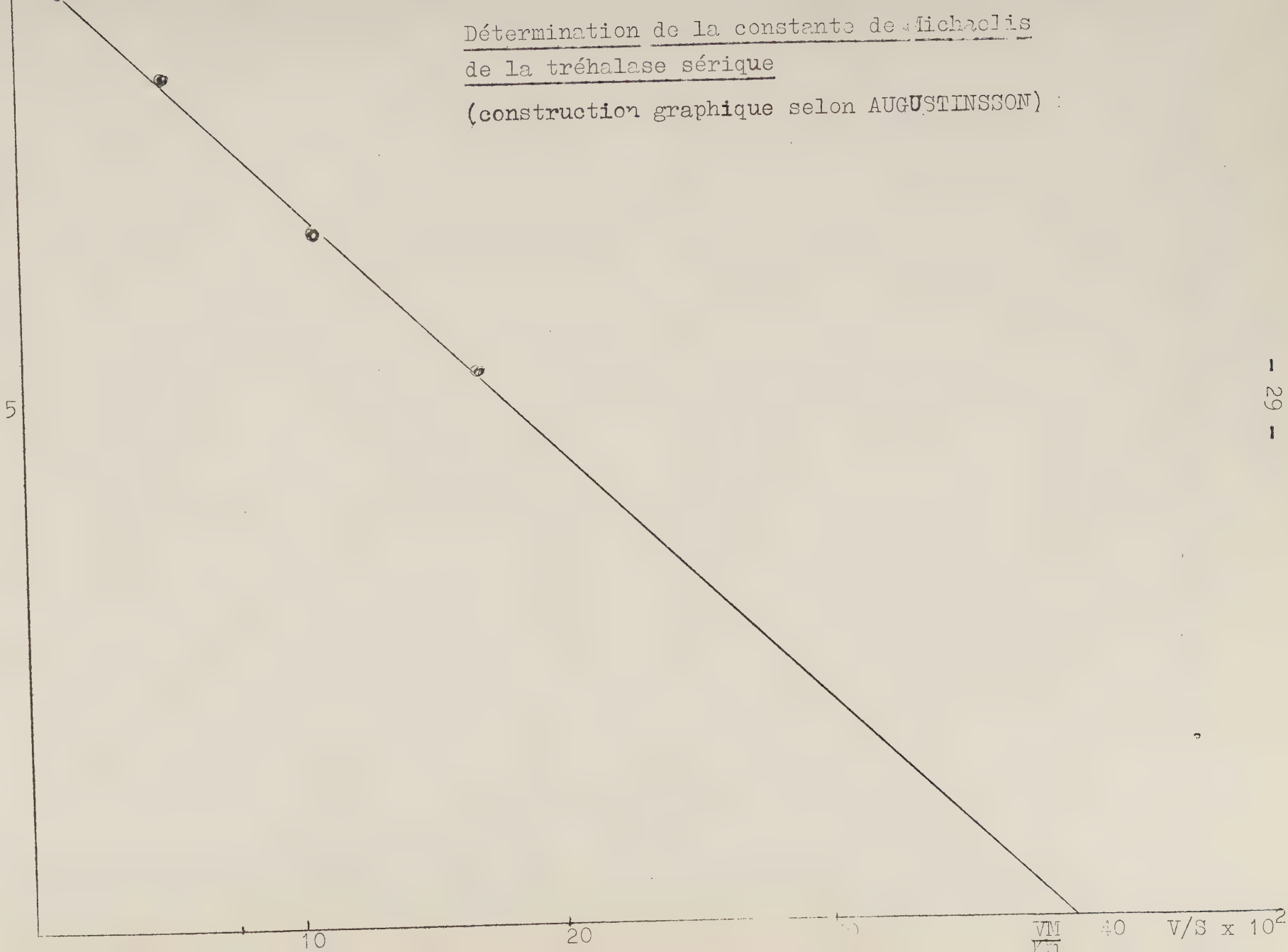
(construction graphique selon LINEWEAVER et BURK)

$Km = 2,3 \times 10^{-3}$ M



Détermination de la constante de Michaelis de la tréhalase sérique

(construction graphique selon AUGUSTINSSON) :



4°) - Hydrolyse du substrat en fonction du temps

Nous avons effectué nos essais à pH 5,7 sur des mélanges de sérums. Le tréhalose se trouvait à la concentration M/30 dans le milieu. Nous avons prélevé des quantités aliquotes du milieu réactionnel toutes les 30 minutes pendant 6 heures. Par ailleurs, l'hydrolyse a été poursuivie pendant 24 et 48 heures. L'activité enzymatique a été arrêtée par l'addition de réactif à l'o-toluidine. Sur chacun de ces échantillons, nous avons déterminé la quantité de glucose libéré par l'hydrolyse enzymatique du tréhalose. Nous avons ensuite calculé le pourcentage de substrat hydrolysé en fonction de la durée de l'incubation.

La figure 8 représente la relation entre l'hydrolyse du tréhalose et le temps d'incubation. La représentation graphique de la relation entre le pourcentage de substrat hydrolysé et le temps est linéaire pendant les six premières heures.

A partir de ces données expérimentales, nous avons calculé la constante de WILHELMY K. à l'aide de l'équation établie par celui-ci :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$$

où t est la durée de l'hydrolyse exprimée en secondes,

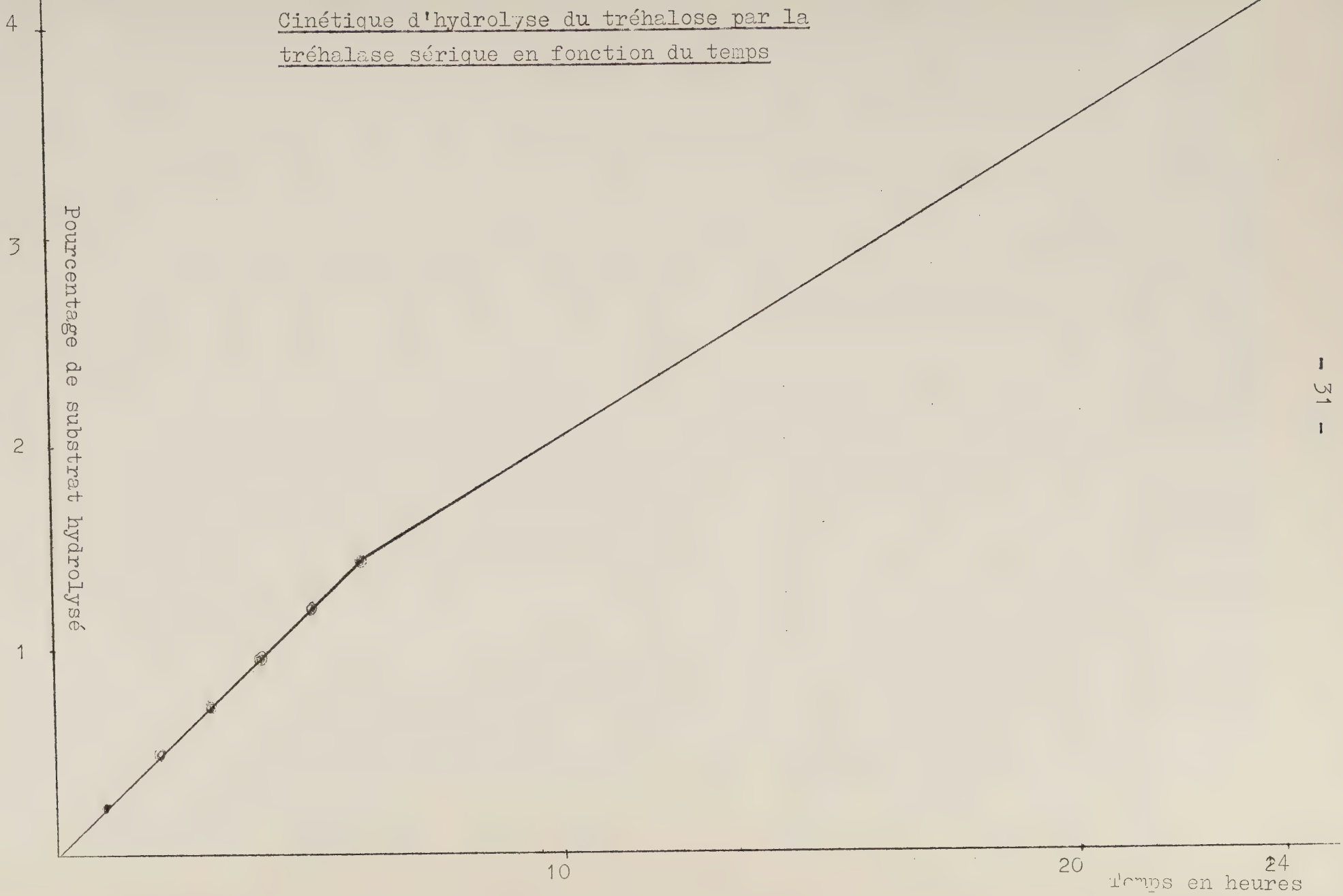
a : la concentration initiale en substrat (100 % correspondant à une concentration M/30 en tréhalose dans le milieu).

x : le pourcentage de substrat hydrolysé au temps t.

log : logarithmes naturels.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau V.

Cinétique d'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase sérique en fonction du temps



T A B L E A U N° V

Hydrolyse du tréhalose en fonction du temps

Durée de la réaction (en heures)	1	2	3	4	5	6	24	48
Pourcentage de substrat hydrolysé	0,3	0,5	0,75	1	1,2	1,4	4,2	8,4
Constante de WILHELMY x 10^{7}	8,2	6,9	6,9	6,3	6,7	6,5	5,1	5,1

L'examen de ces résultats montre que pendant les 6 premières heures la réaction évolue comme une réaction d'ordre zéro dont la vitesse est constante et indépendante de la concentration du substrat. Au delà de 6 heures, la réaction évolue comme une réaction du premier ordre.

Nous avons retenu un temps d'hydrolyse de 3 heures pour nos essais. Afin de chercher la présence éventuelle de substances pouvant avoir une influence sur la réaction, ces essais ont été poursuivis sur des mélanges de sérums dialysés et non-dialysés.

La différence d'activité observée entre les sérums dialysés et non dialysés est de l'ordre de 2 à 3 % ; une telle différence est probablement dûe aux limites de précision des dosages.

Ces résultats nous inclinent à penser qu'il n'y a pas d'inhibiteur dialysable de la tréhalase dans le sérum humain,

bien qu'une telle présence ait été signalée par LUKOMSKAJA et TARASOVA (58) au cours de leurs travaux.

Le sérum sanguin est un mélange de diverses protéines dont certaines peuvent jouer un rôle protecteur vis à vis de l'enzyme.

Pour étudier cette influence nous avons purifié l'enzyme sérique par électrophorèse en débit continu. Nous avons utilisé l'appareillage BECKMAN modèle C P, avec un tampon véronal-véronal sodique de pH 8,6 et de force ionique 0,005. Nous avons ainsi éliminé la majeure partie des fractions albuminiques ainsi que les fractions γ-globuliniques.

Là encore, en dépit de la purification obtenue, l'hydrolyse s'est poursuivie régulièrement. La stabilité de la tréhalase ne semble pas résulter d'un rôle protecteur des autres fractions protéiques du sérum.

B) - Tréhalase urinaire

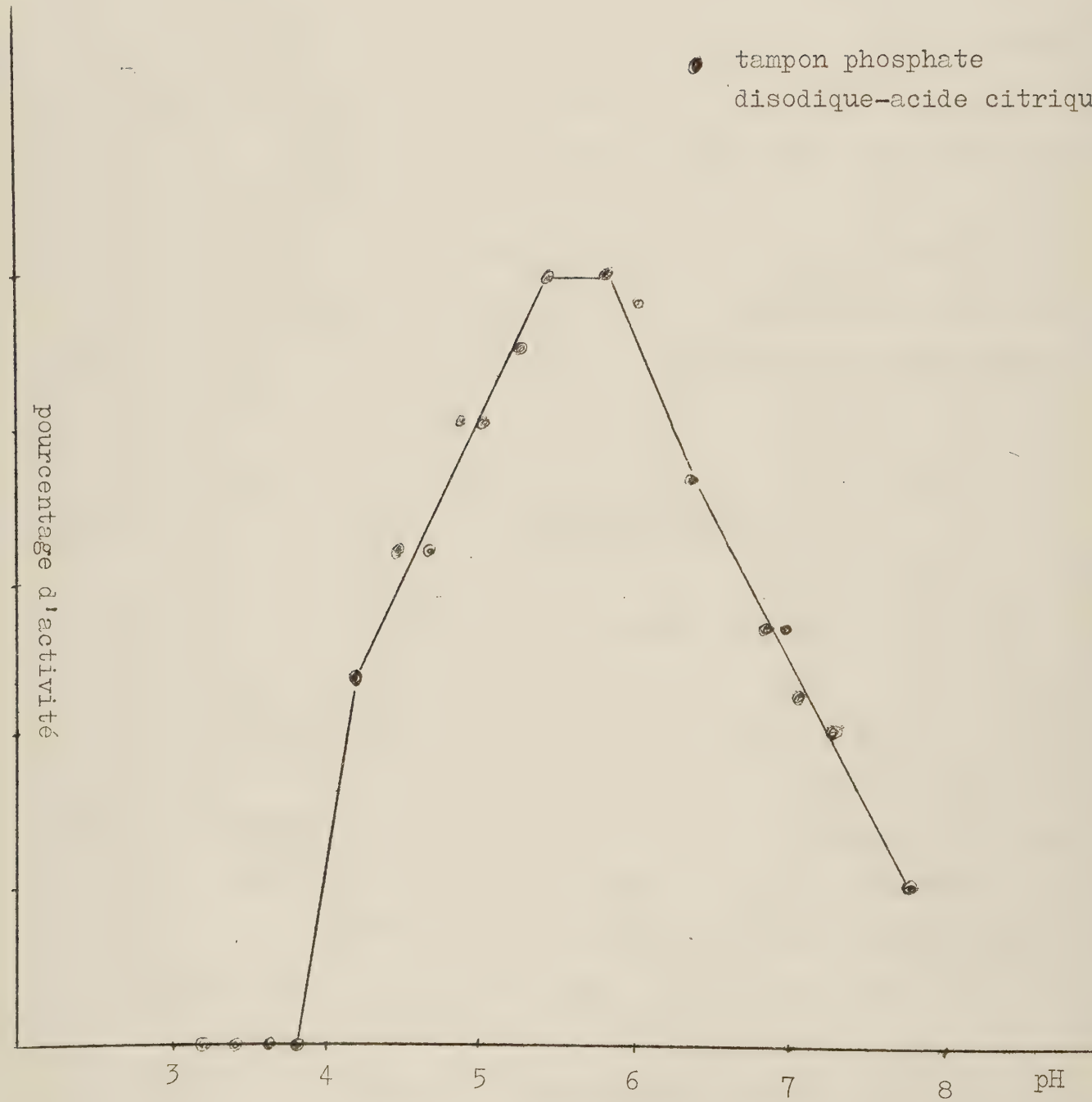
1°) - Détermination du pH optimum

Nos essais ont été effectués sur des urines dialysées 24 heures contre de l'eau distillée, puis concentrées dans le boyau de dialyse par ventilation à la périphérie pendant 12 heures avec de l'air sec à 4°. Le tampon utilisé a été le tampon phosphate disodique-acide citrique de MAC ILVAINE.

Les résultats que nous avons obtenus font l'objet de la figure 9 sur laquelle nous avons porté en abscisses les pH et en ordonnées les pourcentages d'activité.

Figure n° 9

pH optimum de la tréhalase urinaire



L'activité tréhalasique augmente rapidement à partir de pH 4,0 pour atteindre son maximum entre pH 5,5 et 5,9 comme pour l'enzyme sérique. Elle décroit ensuite rapidement dans la zone des pH alcalins.

2°) - Inactivation thermique

Les expériences ont été conduites comme pour l'enzyme sérique selon le protocole décrit précédemment. Les résultats regroupés dans le tableau VI sont similaires à ceux donnés par l'enzyme sérique.

T A B L E A U N° VI

Inactivation thermique de la tréhalase urinaire

Température de l'essai	ESSAIS			% de la moyenne de l'activité résiduelle des trois sujets
	1	2	3	
Essai sans chauffage	1,54	0,95	0,90	100 %
40 °	1,54	0,95	0,90	100 %
45 °	1,54	0,95	0,90	100 %
50 °	1,54	0,95	0,90	100 %
55 °	0,66	0,50	0,11	35 %
60 °	0	0	0	0 %

(Les chiffres de ce tableau sont exprimés en U.Tr.)

3°) - Détermination de la constante de Michaelis

Nous avons effectué la détermination de la constante de Michaelis sur cinq urines dialysées, puis concentrées par ventilation à la périphérie avec de l'air sec à 4°, et nous avons déterminé parallèlement l'activité tréhalasique de ces urines (Tableau VII)

T A B L E A U N° VII

Détermination de la constante de MICHAELIS des tréhalases urinaires par la méthode de LINEWEAVER et BURK

N °	Activité tréhalasique (U. Tr.)	Constante de Michaelis (Km)
1	5	$3,5 \times 10^{-3}$
2	6	$1,9 \times 10^{-3}$
3	6	$2,5 \times 10^{-3}$
4	9	$6,0 \times 10^{-3}$
5	14	$4,5 \times 10^{-3}$

Lorsqu'on examine les valeurs trouvées, on s'aperçoit qu'il existe une plus grande dispersion des Km que dans le cas des sérums. Les Km varient de 1,9 à 6×10^{-3} M.

4°) - Hydrolyse du substrat en fonction du temps

Nous avons effectué nos essais sur cinq urines dialysées puis concentrées par ventilation à la périphérie avec de l'air sec à 4°. Il est également à noter que le tréhalose se trouvait à la concentration de M/100 dans le milieu. L'activité tréhalasique des urines étant faible, l'enzyme est, dans ces conditions, saturée de substrat.

Nous avons prélevé des quantités aliquotes du milieu réactionnel toutes les 24 heures pendant 3 jours. Nous avons travaillé en présence d'une goutte de toluène de manière à prévenir toute contamination microbienne.

Comme dans le cas du sérum, la relation entre le pourcentage de substrat hydrolysé et le temps est linéaire. La réaction évolue comme une réaction d'ordre zéro.

L'activité tréhalasique de l'urine étant très faible, nous avons retenu un temps d'hydrolyse de 24 heures à 37°.

La détermination de l'activité d'une enzyme urinaire est rendue délicate par la présence éventuelle dans les urines de substances susceptibles d'interférer lors du dosage. Pour pallier ces inconvénients, l'activité tréhalasique urinaire sera toujours évaluée sur des échantillons dialysés pendant 24 heures à + 4°C contre de l'eau distillée.

L'urine dialysée a une activité d'environ 40 % supérieure à celle du même volume d'urine après l'émission. (Le volume des urines est mesuré avant et après dialyse, pour tenir compte de l'augmentation due à l'eau apportée par la dialyse).

Dans toutes nos déterminations, nous rapportons les résultats au volume d'urine avant dialyse. Ils font l'objet du Tableau VIII.

T A B L E A U N° VIII

Comparaison de l'activite tréhalasique d'urines avant et après dialyse

Echantillon n°	Urines non dialysées U.Tr.	Urines dialysées U.Tr.	Accroissement de l'activité des urines dialysées
1	0,13	0,46	3,53
2	1,1	1,3	1,18
3	0,9	1,4	1,7
4	0,25	0,43	1,72
5	0,7	1,1	1,57
6	0,6	1,0	1,66
7	2,0	3,8	1,9
8	0,59	0,8	1,35
9	0,24	0,34	1,41
10	0,20	0,24	1,2

Au lieu d'utiliser des urines dialysées, des essais préliminaires nous ont montré qu'il était également possible d'opérer sur les urines après gel-filtration sur Sephadex G 50, dans les conditions décrites par WERNER et coll. (91) pour l'évaluation de diverses enzymes urinaires.

Une colonne de 1 cm de diamètre et 40 cm de longueur est remplie avec du Sephadex G-50 gonflé dans une solution de ClNa à 9 °/₀₀ jusqu'à 11 cm de hauteur.

La solution de ClNa à 9°/₀₀ est utilisée comme éluant. L'éluat est recueilli par fractions de 1 ml. L'on opère sur 3 ml d'urines.

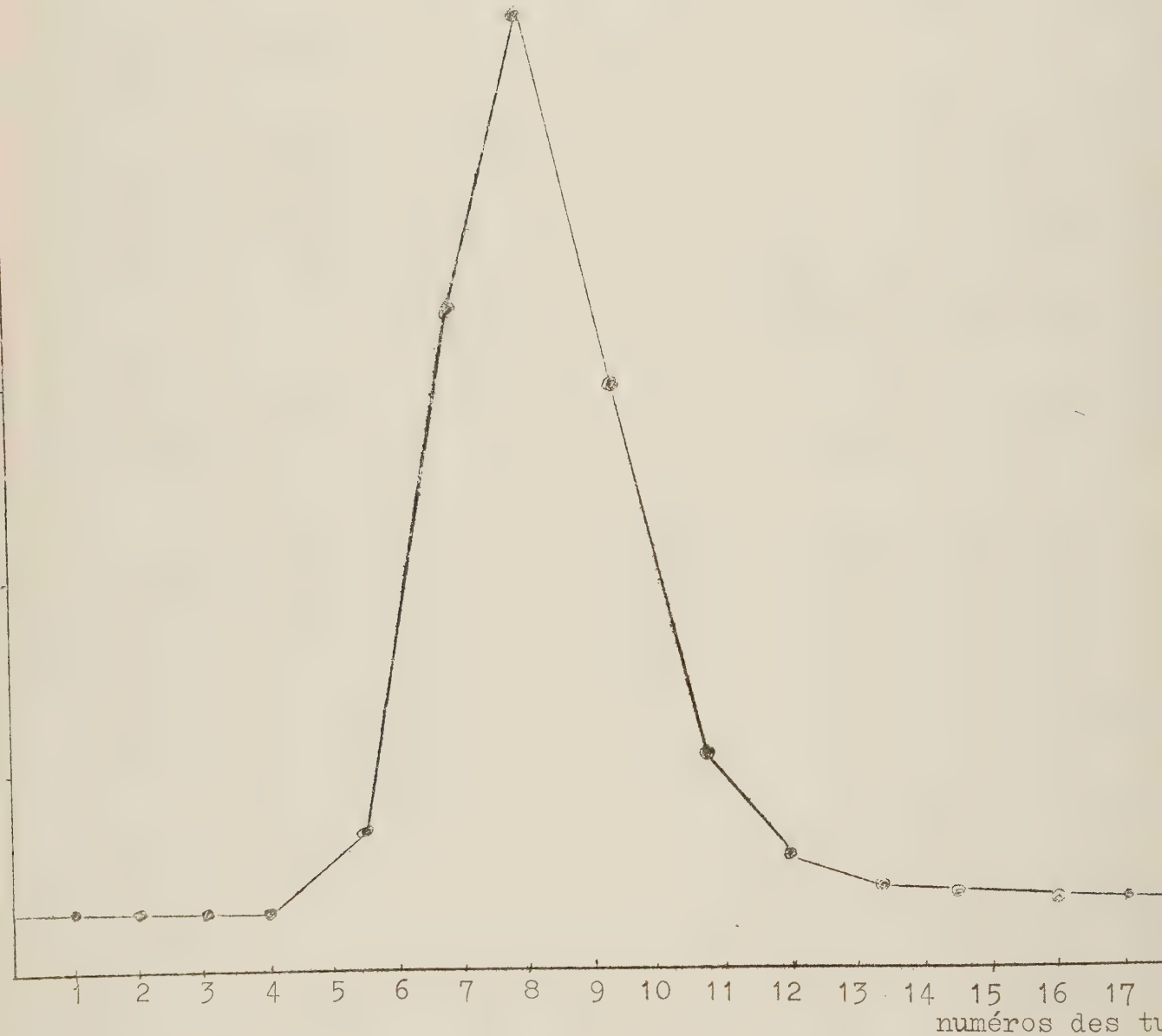
L'analyse de l'activité tréhalasique de chaque fraction nous a permis de tracer le diagramme sur lequel nous avons porté en abscisses les numéros des tubes et en ordonnées les activités tréhalasiques de chaque tube. La tréhalase est contenuedans les tubes 5 à 11 (figure 10).

Ce profil d'élution est le même que celui obtenu par WERNER et coll. pour le dosage de diverses enzymes urinaires : lactate-déshydrogénase, phosphatases alcaline et acide, leucine aminopeptidase, arylsulfatase et β-glucuronidase.

Mais l'activité des urines de sujets sains est très faible ; elle nécessite une incubation de 24 heures à 37°. La filtration sur gel introduit une dilution non négligeable (au demi) très supérieure à celle qu'apporte la dialyse ; c'est la raison pour laquelle, au cours de notre travail, nous avons préféré avoir recours à l'urine dialysée.

Figure n° 10

Gel-filtration de l'urine sur Sephadex G-50



C - Définition du protocole opératoire

Ce sont les résultats que nous venons d'exposer qui nous ont conduite à modifier le protocole établi précédemment par GEORGET (43) pour la détermination de l'activité tréhalasique des sérums. Les différences sont les suivantes :

a) Nous avons modifié le pH de la solution tampon acétique qui a été amené de pH 5,2 à 5,7.

b) Les calculs de Vm nous ont montré que pour que l'enzyme soit saturée de substrat, la concentration en tréhalose du milieu devait être M/30 ; ceci nous a conduit à augmenter la concentration du tréhalose du milieu. Les valeurs des activités tréhalasiques observées sont, de ce fait, plus élevées et nous ont amenée par la suite à définir une nouvelle activité moyenne chez les sujets sains.

c) La vitesse de réaction étant directement proportionnelle au temps, nous avons diminué la durée d'hydrolyse de 6 à 3 heures.

d) Par ailleurs, nous avons substitué au dosage du glucose selon NELSON et SOMOGYI, celui d'HYVÄRINEN et NIKKILÄ à l'orthotoluidine qui donne des résultats similaires. Ceci nous a permis de réduire considérablement la durée du dosage, sans que la sensibilité soit modifiée. Nous avons, en outre, dosé le glucose du milieu parallèlement après défécation par l'acide trichloracétique à 6 %, et sans défécation.

Nous avons obtenu des résultats identiques. Ceci nous a permis de retenir le protocole opératoire suivant :

Dans deux tubes à essais marqués A (dosage) et B (témoin), nous introduisons :

	A	B
- solution de tréhalose M/6	0,5 ml	0 ml
- tampon acétique M/1, pH 5,7	0,25 ml	0,25 ml
- solution de NaF à 1 % *	0,5 ml	0,5 ml
- sérum ou plasma	0,5 ml	0,5 ml
- eau distillée q.s.p. 2,5 ml	0,75 ml	1,25 ml

Après trois heures d'incubation à 37°, nous prélevons 0,5 ml de chacun des 2 tubes que nous mélangeons avec 4,5 ml de solution d'o.toluidine. Puis le dosage du glucose est continué selon le protocole décrit dans le chapitre II, page 9.

Le dosage de l'activité tréhalasique des urines s'effectue sur les urines dialysées selon le protocole opératoire suivant :

Dans un tube à essais marqué A (dosage), nous introduisons :

	A
- solution de tréhalose M/20	0,5 ml
- tampon acétique M/1, pH 5,7	0,25 ml
- solution de NaF à 1 %	0,5 ml
- urine dialysée	0,5 ml
-eau distillée q.s.p. 2,5 ml	0,75 ml
- toluène	1 goutte

* Ce corps n'inhibe pas la tréhalase, mais inhibe les enzymes glycolytiques.

Après 24 heures d'incubation à 37°, nous prélevons 0,5 ml que nous mélangeons avec 4,5 ml d'o.toluidine. Le dosage du glucose est poursuivi selon le protocole décrit dans le chapitre II, page 9.

Un témoin n'est pas indispensable, le pouvoir réducteur de l'urine normale dialysée est pratiquement nul.

Calcul

Les résultats sont exprimés en micromolécules de tréhalose hydrolysées par minute et par litre de sérum ou d'urine après l'émission, à 37°C et à pH 5,7.

L'unité tréhalasique (U. Tr.) correspond ainsi aux unités définies par l'Union Internationale de Biochimie.

Pour l'exposé du mode de calcul, nous envisagerons successivement :

- la valeur numérique de la prise d'essai,
- la quantité de glucose libéré par l'hydrolyse,
- la valeur numérique de la micromole,
- et la durée de l'incubation.

La détermination du pouvoir réducteur du mélange s'effectue sur une prise d'essai de 0,5 ml du mélange réactionnel.

Soit - X_1, la teneur en glucose, exprimée en µg, du tube correspondant à l'hydrolyse enzymatique (Essai) ;

- X_2, la teneur en glucose, exprimée en µg, du tube correspondant au pouvoir réducteur initial du sérum (Témoin).

La quantité de glucose provenant de l'hydrolyse du tréhalose dans ces 0,5 ml sera égale à : $(X_1 - X_2)$ µg.

Le volume total du milieu d'incubation est de 2,5 ml et le glucose libéré dans ce volume provient de l'activité enzymatique de 0,5 ml de sérum ; pour 1 litre de sérum la quantité de glucose libéré sera donc égale à :

$$\frac{(X_1 - X_2) \times 5 \times 10^3}{0,5} = (X_1 - X_2) \times 10^4.$$

Une micromolécule de tréhalose libère par l'hydrolyse deux molécules de glucose, soit 360 µg de glucose.

L'incubation est maintenue pendant 3 heures pour les sérums, soit 180 minutes et pendant 24 heures pour les urines, soit 1440 minutes.

Le nombre de micromolécules hydrolysées en 1 minute et par 1 litre de sérum sera donc :

$$\frac{(X_1 - X_2)\ \mu g \times 10^4}{360 \times 180} = \text{U.Tr.}$$ ou, après simplification :

$(X_1 - X_2)\ 0,154 = \text{U.Tr.}$

Pour le cas de l'urine qui n'a pas de témoin :

$$\frac{X_1 \times 10^4}{360 \times 1440} = \text{U.Tr.}$$ ou $X_1\ 0,0193 = \text{U.Tr.}$

D - Conditions de prélèvement des échantillons

a) - Sérum

Nous reproduisons un tableau emprunté à GEORGET (43).

T A B L E A U N° IX

Conservation de l'activité tréhalasique du sérum en fonction du temps

rée de conservation en jours	0	5		17	
Température de conservation		4°	20°	4°	20°
Lot analyse n° 1	10,1	9,7	9,3	8,9	7,7
n° 2	2,2	2,05	1,9	2,05	1,5
n° 3	4,2	4,3	4,2	4,1	3,9

On voit que la tréhalase sérique est une enzyme peu sible au vieillissement. On peut conserver les sérums pendant sieurs jours à la température ordinaire si nécessaire, ou ux, à la glacière.

b) - Urines

Nous avons vérifié que l'enzyme, à un aussi faible x, n'était pas adsorbée sur les parois des récipients en re. Des urines ayant subi plusieurs transvasements successifs, s des récipients de laboratoire variés, ont conservé la même ivité tréhalasique.

La centrifugation à 3000 t/min. pendant 10 minutes l'urine fraichement émise ne semble pas indiquer que la halase soit localisée dans des éléments cellulaires sédi- tables.

La stabilité de l'activité tréhalasique de l'urine de 17 sujets différents a été étudiée en fonction du temps et de la température.

Des parties aliquotes des divers échantillons ont été conservées à la température du laboratoire pendant 24 et 48 heures, d'autres à 4°C pendant le même laps de temps.

La moyenne des résultats que nous avons obtenus, nous a permis de tracer la courbe 11 sur laquelle nous avons porté en abscisses les temps de conservation et en ordonnées les pourcentages d'activité des échantillons.

La courbe en trait plein correspond aux urines conservées à la température du laboratoire ; celle en pointillé à celles conservées à + 4°C.

L'activité tréhalasique des urines est relativement stable lorsque celles-ci sont conservées à 4°C. La baisse d'activité en 48 heures n'est que de 10 %.

Il n'en est pas de même lorsque les urines sont conservées à la température du laboratoire. L'activité diminue alors très rapidement ; la baisse est déjà de 20 % après 24 heures de conservation, de 70 % après 48 heures.

Nous nous sommes cependant demandée si ces baisses d'activité n'étaient pas dûes au changement de pH du milieu.

5 urines différentes ont alors été conservées à 4°C pendant 4 jours. Une partie aliquote de ces urines ayant été recueillie sur une solution tampon de pH 5,7 (urine/tampon acide acétique M : 2/1 V/V), nous avons comparé l'activité des divers échantillons en fonction du pH.

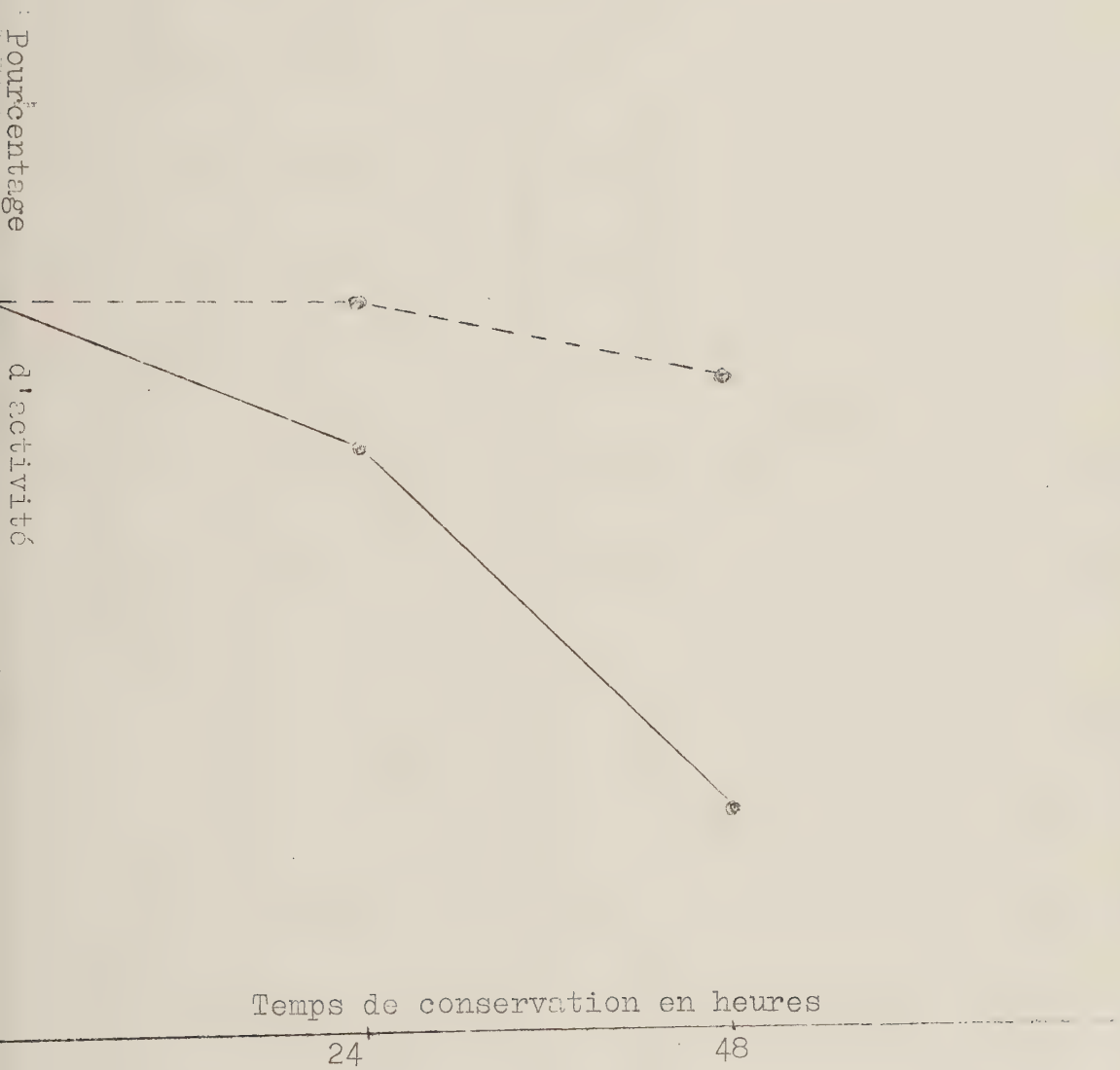
Les résultats que nous avons effectué font l'objet du tableau X.

Figure N° 11

Moyenne de conservation des urines
de 17 sujets en fonction du temps

— — — — Urine conservée à 4°C

———— Urine conserveé à la température du laboratoire



T A B L E A U N° X

Comparaison de l'activité tréhalasique d'urines tamponnées et non tamponnées en fonction du temps

N° du sujet	Température de conservation : 4°				
	Durée de conservation (en jours)	pH de l'urine	Pourcentage d'activité	pH de mélange urine et tampon (2/1)	Pourcentage d'activité
N° 1	1	5,42	100	5,55	100
	2	5,44	100	5,57	100
	4	5,90	89	5,7	41
N° 2	1	6,91	100	5,73	100
	2	7,04	100	5,77	100
	4	7,25	71	6,0	35
N° 3	1	5,66	100	5,56	100
	2	5,69	100	5,59	100
	4	6,19	65	5,93	42
N° 4	1	5,34	100	5,56	100
	2	5,38	100	5,70	100
	4	5,65	75	5,90	40
N° 5	1	5,63	100	5,58	100
	2	5,66	100	5,88	100
	4	7,0	30	6,09	37

Lorsque l'urine est conservée en présence de solution ampon, ou lorsque le pH urinaire ne varie pas sensiblement, 'activité tréhalasique après conservation de 48 heures à °C se maintient. Par la suite, les urines non tamponnées s'al-alinisent et l'activité tréhalasique baisse fortement. Mais 'alcalinisation n'est certainement pas la seule cause de la aisse d'activité.

- ° -

Chapitre II - INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LES VALEURS DE LA TREHALASEMIE ET DE LA TREHALASURIE

A) - Précision de la méthode

L'erreur d'une détermination (ε) a été calculée à partir de la différence (d) trouvée entre deux dosages effectués sur un même échantillon :

$$\varepsilon = \sqrt{\frac{\Sigma\, d^2}{2\,n}}$$

n représentant le nombre d'échantillons.

Le coefficient de variation (C.V.) a été calculé en rapportant l'erreur à la moyenne arithmétique (m) de l'ensemble des dosages :

$$C.V.\ \% = \frac{\varepsilon}{m} \times 100$$

Résultats :

a) Sérums

L'erreur de la méthode proposée, exprimée en coefficient de variation a été de 1,27 % (n = 55).

$\varepsilon = 0,272$

$$C.V.\ \% = \frac{\varepsilon \times 100}{m} = \frac{0,272 \times 100}{21,4} = 1,27\ \%$$

b) Urines

L'erreur de la méthode proposée exprimée en coefficient de variation a été de 2,6 %.

$\varepsilon = 0,0266$

$$C.V.\ \% = \frac{0,0266 \times 100}{1,020} = 2,6\ \%$$

B) - Résultats

a) Sérums

Nous avons analysé les sérums de 115 sujets en bonne anté. Les activités tréhalasiques sériques ne se répartissen+ as selon des distributions normales.

Si l'on porte en abscisses les unités tréhalasiques t en ordonnées sur une échelle gaussienne, les effectifs umulés relatifs, on obtient une courbe qui s'infléchit pour es valeurs les plus élevées ; par contre, si l'on effectue une namorphose sous la forme d'un diagramme gausso-logarithmique n remplaçant en abscisses les unités tréhalasiques par leurs ogarithmes, on obtient une droite (figure 12) : les distri- utions observées sont log-normales. Les activités tréhalasiques ériques des sujets sont représentées par les histogrammes e la figure 13.

Les valeurs des moyennes arithmétiques sériques 'échelonnent de 2,3 à 75 U.Tr. chez les sujets normaux ; a moyenne générale de 115 déterminations est de 25,5 U.Tr. a moyenne logarithmique : 1,284

σ^2 : 0,0733 σ : 0,272

L'intervalle de confiance de la moyenne logarithmique u coefficient de sécurité de 95 % est 1,284 $\pm$ 0,050 et au oefficient de sécurité de 99 % est 1,284 $\pm$ 0,066.

Figure nº 12

Construction de la droite de Henry

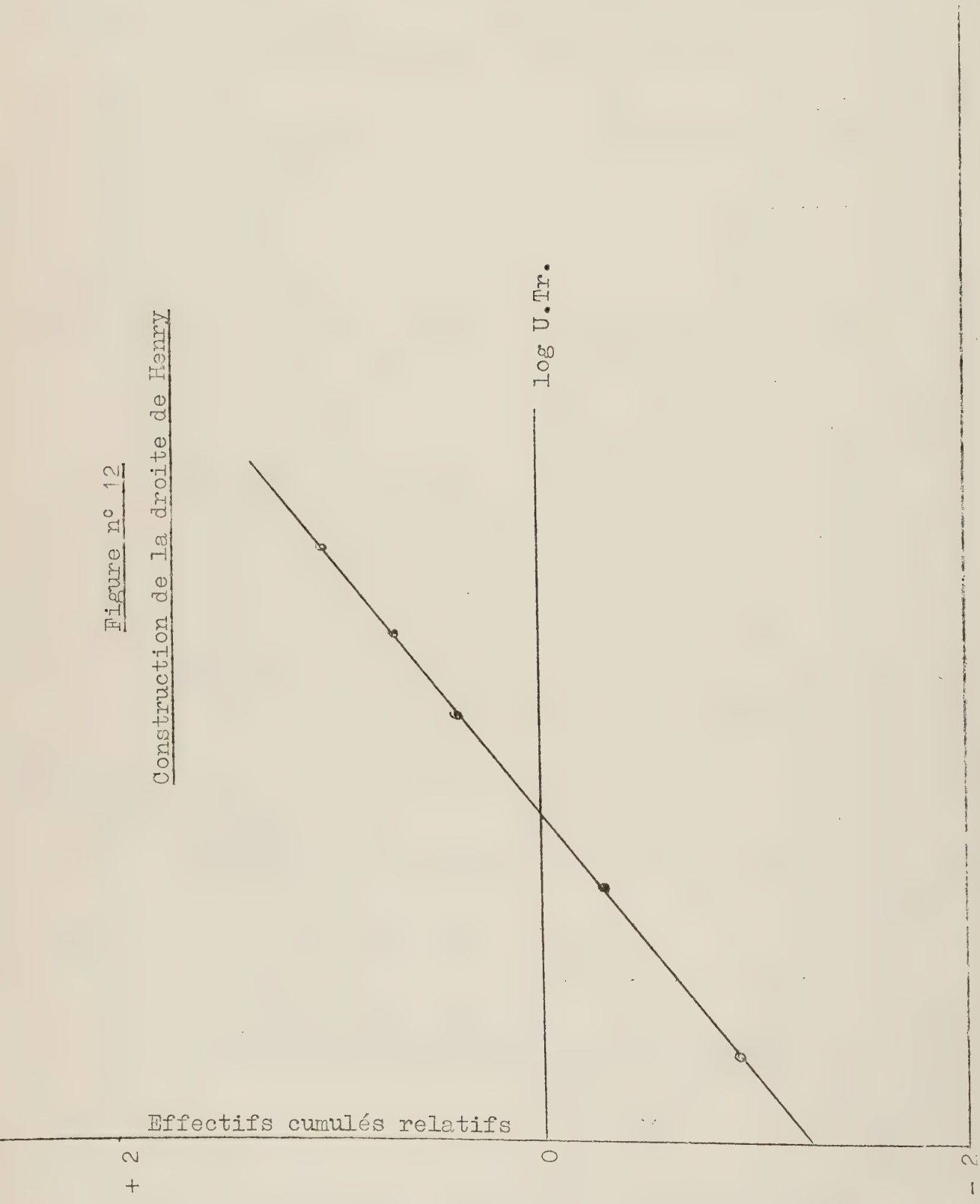
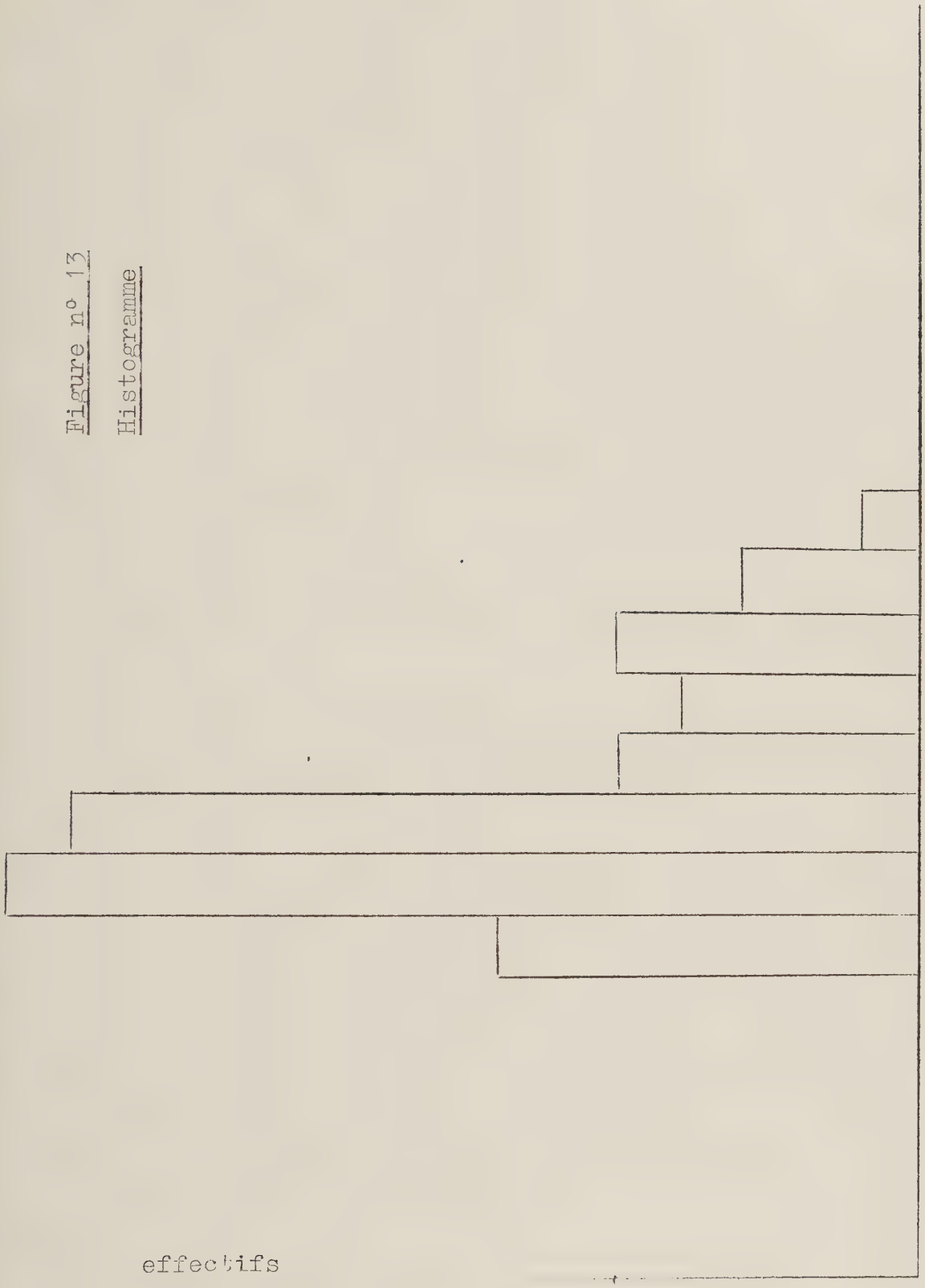


Figure n° 13

Histogramme



b) Urines

De même que pour les sérums les distributions observées sont log-normales. Les valeurs arithmétiques urinaires s'échelonnent de 0,18 à 6,9 U.Tr. chez les sujets normaux ; la moyenne générale de 80 déterminations est de 0,61 U.Tr.

Afin d'obvier aux variations de l'excrétion de l'enzyme en fonction de la diurèse, l'activité tréhalasique a été rapportée à la concentration en créatinine des urines.

Ce mode d'expression des résultats a été constaté par de nombreux auteurs. L'élimination urinaire de la créatinine est loin d'être constante selon les sujets étudiés (89) ; elle est sous la dépendance étroite du régime alimentaire (80) (11). L'état psychique du patient peut avoir également une influence (74) (12).

Cependant, une étude poussée de l'élimination urinaire de diverses enzymes : leucine amino peptidase, lactico-déshydrogénase, arylsulfatase, phosphatase acide et alcaline, β glucuronidase, a été effectuée par WERNER et coll. (90). Ils ont rapporté parallèlement l'activité enzymatique urinaire au volume des urines, à la concentration en créatinine, au poids du sujet, à la surface corporelle. Leur étude a été conduite de manière statistique. Ils sont arrivés à la conclusion suivante que, lorsqu'il s'agit du dosage d'une enzyme, la relation de son activité à l'élimination de la créatinine est parfaitement valable.

Influence de différents facteurs sur les valeurs de la tréhalasémie et de la tréhalasurie

La tréhalase est la seule disaccharidase présente régulièrement dans le sérum humain (43) (18) (86). Tous les auteurs sont d'accord pour observer des écarts assez nets d'activité d'un sujet à l'autre. Par contre, chez un même sujet, le taux de la tréhalase sérique demeure assez stable (88).

L'objet de ce chapitre a pour but de rechercher les causes possibles de cette large variation de l'activité de la tréhalase sérique humaine. Nous avons donc étudié l'influence de différents facteurs.

(A) - SERUMS

1°) - Influence de l'appartenance à des groupes sanguins différents

Nous avons étudié l'influence de l'appartenance à un groupe sanguin sur l'activité tréhalasique des sujets.

Parmi les 113 sérums analysés, 50 d'entre eux appartenaient au groupe A, 49 au groupe O et 14 au groupe B *.

Les moyennes arithmétiques et logarithmiques, l'écart type de chaque catégorie de groupe sanguin, sont rassemblés dans le tableau XI.

---

* Les sérums nous ont été fournis par la banque de sang de l'Hôpital Laënnec.

T A B L E A U N° XI

Valeur de l'activité tréhalasique sérique

en fonction du groupe sanguin

Groupe sanguin	Nombre de sujets	Moyenne arithmétique	Moyenne logarithmique	σ^2	σ	Sm
A	50	21,9	1,271	0,0383	0,196	0,0280
B	14	23,9	1,245	0,0824	0,287	0,0800
O	49	29,7	1,360	0,1140	0,338	0,0488

Nous avons ensuite comparé 2 à 2 les moyennes par le calcul de l'écart standard de la distribution des différences

$$Sd = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

Lorsque l'effectif des échantillons était inférieur à 30, nous avons utilisé la table de t et l'expression :

$$Sd = \sigma_e \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

$$\sigma_e = \sqrt{\frac{n_1 \sigma_1^2 + n_2 \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Nos résultats font l'objet du tableau XII.

Les différences des moyennes des logarithmes des activités tréhalasiques entre groupe O et A, entre groupe O et B et entre groupe A et B, qui sont inférieures à 2 Sd ne peuvent pas être considérées comme significatives.

T A B L E A U N° XII

Comparaison des moyennes des logarithmes des activités tréhalasiques des groupes sanguins

	$m_1 - m_2 = d$	Sd
O et A	0,089	0,055
O et B	0,115	0,091
A et B	0,026	0,082

Les différences observées entre les activités tréhalasiques des sujets sains en fonction de leur groupe sanguin nous apparaissent ainsi comme fortuites.

Il existe une petite divergence entre nos résultats et ceux de EZE et coll. (40) pour lesquels il existe, en fonction du groupe sanguin, une différence des activités tréhalasiques faible mais significative.

2°) - Influence de la race

Un chercheur de notre laboratoire a découvert , en 1962, une forte augmentation de la tréhalasémie chez une diabétique d'origine Antillaise. Nous avons cherché à savoir si l'activité tréhalasique sérique variait en fonction de la race. Nous avons ainsi analysé les sérums de 106 sujets Africains de race noire appartenant à 24 pays différents et à 58

ethnies variées *. Il s'agissait de donneurs résidant en France, ayant accepté de subir leur prélèvement à l'Hôpital Cochin à Paris. La technique de dosage pour les Noirs est identique à celle employée pour déterminer la moyenne générale.

Résultats

Nous avons regroupé dans le tableau XIII l'ensemble des résultats que nous avons obtenus à partir d'Africains noirs. Nous y avons adjoint, à la fin, six résultats de donneurs d'origine asiatique. Le faible nombre d'individus à l'intérieur de chaque groupe ethnique n'a pas permis une étude statistique.

Nous avons donc considéré l'ensemble des résultats dont les valeurs arithmétiques s'échelonnent de 1 à 42 U.Tr. chez les Africains noirs.

Moyenne générale de 104 déterminations : 9,3 U.Tr.

Moyenne logarithmique : 0,852

σ^2 : 0,0965

σ : 0,311

Nous avons comparé deux à deux les moyennes des activités tréhalasiques de l'ensemble des sujets de race noire à celles de l'ensemble des sujets de race blanche.

Nos résultats font l'objet du tableau XIV.

---

* Ils nous ont été fournis par Monsieur le Professeur de TRAVERSE, Directeur de l'Institut de Biologie de l'Hôpital Cochin, et le Docteur JAEGER, Directeur du C E A B H (Centres Européens associés de Biologie Humaine), que nous sommes heureuse de remercier pour leur extrême obligeance.

T A B L E A U N° XIII

Activité tréhalasique des sujets noirs

Pays	Ethnie	Nombre de Sujets	Moyenne des Activités	Valeurs extrêmes
MADAGASCAR	Merina	8	3,2	1,5 - 6,0
"	Hova	3	9,2	5,8 - 13,0
"	Sikanaka	2	8,7	4,9 - 12,5
"	Betsiles	2	2,1	1,0 - 3,2
"	Antesaka	1	3,5	
"	Meima	1	4,0	
SENEGAL	Ouolof	8	4,1	1,4 - 9,9
"	Sérère	2	14,5	4,6 - 24,3
"	Créole	1	5,2	
"	Sarakole	1	8,6	
"	Toucouleur	1	6,0	
"	Massi	1	6,0	
OTE D'IVOIRE	Apollo	2	7,5	5 - 10
"	Dioulas	2	10	9 - 10,8
"	Baold	1	3,0	
"	Bete	1	10,2	
"	Knolaou	1	16,6	
"	Agni	1	2,5	
"	Semofo	1	14	
NIGER	Acussa	3	6,2	2,4 - 13,2
TOGO	Ewe	4	11,3	6 - 16,2
"	Wami	1	4,0	
"	Tchokossi	1	14,8	
"	Mina	1	10,8	
"	Cotokoli	1	24,0	

T A B L E A U N° XIII (suite)

Activités tréhalasiques des sujets noirs

Pays	Ethnie	Nombre de Sujets	Moyenne des Activités	Valeurs extrêmes
CAMEROUN	Batwe	2	10,4	8 - 12,8
"	Bassa	2	4,8	1,6 - 8
"	Boulu	1	7,0	
"	Bufut	1	3,0	
"	?	1	20,0	
ZAÏRE	Mukongo	2	7,3	5,7 - 9
"	Mutuba	2	32,8	23,6 - 42,1
"	Bamema	1	34	
"	Bassongue	1	24,6	
HAUTE-VOLTA	Massi	3	8	5,4 - 10,7
"	Lobi	1	9,5	
"	Peulh	1	9,5	
MALI	Bambara	2	9,4	9,4 - 9,5
"	Malenké	2	9,8	5,2 - 14,4
"	Peuhl	1	4,6	
UGANDA	Muganda	2	4,8	4,3 - 5,3
"	Mutoro	1	9,8	
DAHOMEY	Fon	2	13,5	13 - 14
"	Yomba	1	18,1	
"	Lago	1	12,3	
CONGO-BRAZZAVILLE	Lari	1	12,6	
"	Vili	1	10,6	
"	Kibwess	1	4,1	

T A B L E A U N° XIII (fin)

Activités tréhalasiques des sujets noirs

Pays	Ethnie	Nombre de Sujets	Moyenne des Activités	Valeurs extrêmes
TANZANIE	Gogo	1	26,1	
"	Djita	1	8,6	
"	Subuma	1	9,8	
COMORES	-	3	3,1	2 - 4,8
KENYA	Kikuyu	1	15,6	
"	?	1	5,6	
TCHAD	Sara Laï	2	19,7	15,7 - 23,7
ETHIOPIE	Tigre	1	9,1	
"	Gala	1	4,0	
GABON	Bakota	1	9,0	
"	Mfongné	1	4,9	
République re Africaine	Métis	2	8,4	6 - 10,8
GHANA	Ga	1	40,0	
AURITANIE	Soninki	1	4,0	
BURUNDI	Tutsi	1	10,8	
HAITI	-	1	16,5	
CAMBODGE	-	4	7	6 - 8,3
INDE	-	1	3,5	
SYRIE	-	1	7,5	

T A B L E A U N° XIV

Activité de la tréhalase sérique de sujets de race différente : calcul statistique - comparaison des moyennes

Race	Nombre de sujets	Moyenne Arithmétique	Moyenne Logarithmique	σ^2	σ	$m_1 - m_2 = d$	Sd
blanche	115	25,5	1,284	0,0733	0,272	0,432	
noire	104	9,3	0,852	0,0965	0,311		

On voit que la différence des moyennes $m_1 - m_2$, bien supérieure à 2,6 Sd , est très significative.

L'activité de la tréhalase sérique des sujets de race noire est ainsi significativement plus faible que celle des sujets de race blanche. Il ne s'agit peut-être que d'une coïncidence, mais quatre des six donneurs originaires du Zaire et un Ga du Ghana ont des teneurs en tréhalase sérique largement supérieures à la moyenne générale.

3°) - Influence de la présence éventuelle dans le sérum d'inhibiteurs de la tréhalase

a) expérience par coupage

Nous avons cherché à savoir si les variations du taux de la tréhalase dans le sérum ne paraissent pas être reliées selon les cas, soit à la présence d'un inhibiteur, soit à celle

d'un activateur.

Quatre essais de coupage ont été effectués sur des sérums actifs avec des sérums peu actifs.

Les niveaux d'activité tréhalasique ont été déterminés parallèlement pour chaque groupe d'essai :

- sur un sérum actif,
- sur un sérum peu actif,
- sur les dilutions 1/4, 1/2, 3/4 du sérum actif dans le sérum peu actif.

Au cours de ces quatre essais, nous avons obtenu des résultats identiques ; à titre d'exemple, le tableau XV montre un de ces résultats exprimés en U.Tr. et les U.Tr. escomptées par le calcul.

T A B L E A U N° XV

Coupage de sérum actif par un sérum peu actif

e de dilution du sérum		Unités tréhalasiques trouvées	Unités tréhalasiques escomptées par le calcul
de sérum actif	ml de sérum peu actif		
2	0	38	38
1,5	0,5	26	28
1	1	20	21
0,5	1,5	12	12
0	2	4	4

Il résulte de l'ensemble des essais effectués qu'il ne semble pas y avoir dans le sérum peu actif, d'inhibiteur abaissant nettement l'activité du sérum actif.

b) expérience par dialyse

Plusieurs essais de dialyse ont été effectués sur des sérums. Ces sérums sont dialysés en sac de cellophane contre une solution de NaCl à 9 °/₀₀ pendant 24 heures à 4°C.

T A B L E A U N° XVI

Comparaison des activités tréhalasiques des sérums avant et après dialyse

Sérums	Unités tréhalasiques du sérum	Unités tréhalasiques du sérum après dialyse
1	3	2,8
2	4,3	4,1
3	5,0	5,5
4	15,5	16,3
5	28,3	28,8

Ainsi la dialyse des sérums ne met pas en évidence un inhibiteur dialysable.

Nous n'avons pas retrouvé, dans les sérums, l'inhi-
iteur dialysable mis en évidence par LUKOMSKAJA (58).

B) - URINES

1°) - Variations circadiennes

Les éliminations de la tréhalase et de la créatinine
ont été suivies chez 8 sujets, pendant 5 jours ; chaque journée
étant divisée en deux périodes de 12 heures (jour : 8 h - 20 h,
nuit : 20 h - 8 h).

La totalité des urines émises pendant chaque période
est mélangée. Les résultats sont rassemblés sur la figure 14 ;
nous avons matérialisé le rapport U.Tr./Créatinine diurne par
des cercles, le rapport nocturne par des croix.

Il existe une certaine variation dans l'élimination
urinaire de la tréhalase selon les sujets, et, pour un individu
donné, avec le temps. Cependant, la comparaison statistique de
l'ensemble des valeurs obtenues au cours de la journée avec celles
de la nuit, montre que la différence est fortuite (tableau XVII,
paragraphe II).

Il n'y a donc pas de variations circadiennes signi-
ficatives bien que certains individus excrètent régulièrement
plus de tréhalase pendant le jour que pendant la nuit. Ceci
paraît être en relation avec l'activité physique pendant la
journée, ainsi qu'il résulte des essais après l'effort que nous
allons décrire.

2°) - Influence du sexe

Nous avons analysé les urines de sujets en bonne santé, 20 d'entre eux étaient de sexe masculin, 29 d'entre eux de sexe féminin.

La comparaison statistique de l'élimination urinaire de la tréhalase chez l'Homme et chez la Femme montre que la différence entre les valeurs est purement fortuite (tableau XVII, paragraphe III).

T A B L E A U N° XVII

Elimination urinaire de la tréhalase en fonction du rythme circadien et du sexe - calculs statistiques, comparaison des moyennes

	Nombre de Sujets	Moyenne arithmétique U.Tr./ créatinine	Moyenne logarithmique m	$m_1 - m_x = d$	σ^2	σ	Sm	
I	77	0,433 (0,12 - 1,3)	0,588		0,0459	0,214	0,0245	
II variations circadiennes	8 jours 5 sujets 40 essais	jour : 0,89 (0,2 - 5,0)	0,8097	0,0564	0,1382	0,372	0,0588	0
		nuit : 0,72 (0,2 - 6,0)	0,7533		0,0759	0,275	0,0434	
III Sexe	20	♂ : 0,427 (0,12 - 1,3)	0,131	0,0863	0,138	0,371	0,085	0
	29	♀ : 0,358 (0,14 - 0,8)	0,0447		0,0464	0,216	0,041	

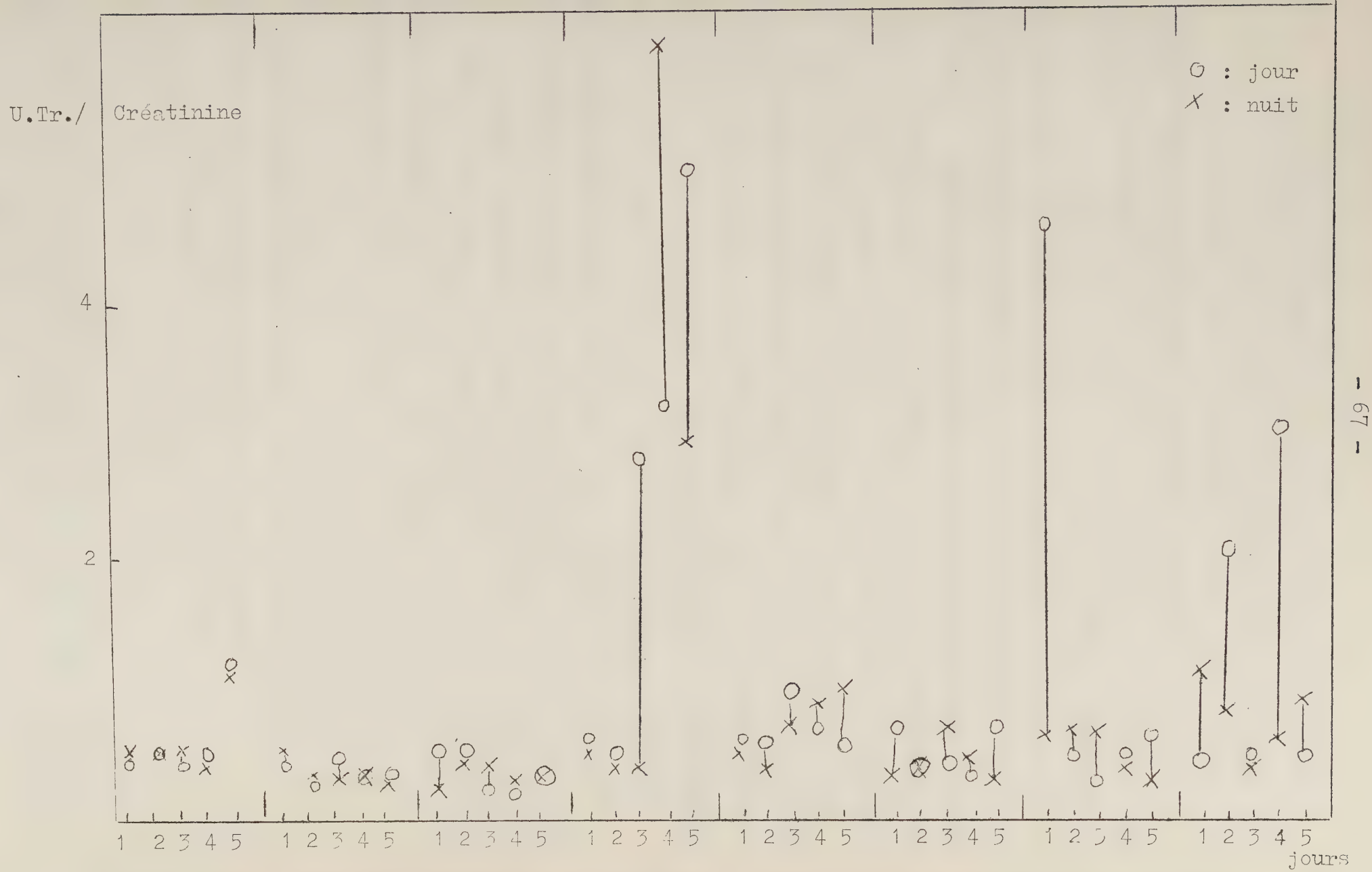


Figure n° 14 : Excrétion urinaire de la tréhalose chez huit sujets en fonction du temps

(C) - INFLUENCE DE L'EFFORT

Au cours des dernières années, un certain nombre de publications ont porté sur le comportement de diverses enzymes au cours de l'effort.

Nous citerons en particulier la lactico déshydrogénase et ses isoenzymes (66) (8), les transaminases glutamique oxalacétique, glutamique pyruvique, la créatine phosphokinase (8), dont on observe une augmentation notable, d'intensité d'ailleurs variable.

Etant donné la répartition relativement limitée de la tréhalase chez l'Homme (19) et en particulier son absence dans le muscle, il nous a paru intéressant d'étudier le comportement de cette enzyme au cours de l'effort.

Sujets :

Dans tous les cas, nous avons analysé les urines de sujets en bonne santé. Les échantillons destinés à l'étude des variations de la tréhalasurie au cours de l'exercice physique provenaient de membres du Paris Université Club *.

Nous distinguerons :

a) l'effort physique modéré : parties amicales de tennis de 1 à 2 h.

b) l'effort physique intense, mais de courte durée : séances d'entrainement, de 20 minutes, des basketteurs de l'équipe première du P.U.C.

---

* Nous exprimons tous nos remerciements à Monsieur Fathi DRISS, Interne à l'Hôpital LAENNEC, joueur international de basket-ball, qui nous a très amicalement procuré le sang et les urines de lui-même et de ses co-équipiers.

c) l'effort physique intense et prolongé : matches du Championnat National de cette équipe.

Des essais ont été effectués sur ces sujets avant l'effort, immédiatement après l'effort et après deux heures de repos lui succédant.

Au cours de l'effort, l'élimination de la tréhalase urinaire est notablement accrue. Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau XVIII.

Cette augmentation est fonction de l'intensité de l'effort. L'activité de l'urine triple après un effort modéré alors qu'elle augmente d'environ 20 fois au cours d'un effort violent et prolongé. Elle n'augmente que de 6 fois environ après un effort intense mais limité dans le temps.

Le rapport U.Tr. / Créatinine varie aussi d'une façon importante et en fonction de l'intensité de l'effort. L'augmentation de ce rapport montre bien que la variation de l'activité de la tréhalase urinaire n'est pas due à l'émission d'une urine plus concentrée par suite de la transpiration.

Quelques-uns de nos résultats font l'objet du tableau XIX sur lequel figurent, non seulement l'activité tréhalasique, mais également le rapport U.Tr. / Créatinine et la protéinurie.

T A B L E A U N° XVIII

Activité tréhalasique urinaire au cours de l'effort

Nature de l'effort		Nombre de cas	Activité tréhalasique U.Tr.		Rapport $\frac{\text{U. Tr.}}{\text{g. créatinine / l}}$	
			Moyenne	Valeurs extrêmes	Moyenne	Valeurs extrêmes
Violent et prolongé	Avant	8	0,35	0,10 - 0,80	0,25	0,10 - 0,60
	Après		6,70	3,30 - 1[illegible]	2,90	0,45 - 5,70
Intense mais durée limitée	Avant	14	0,53	0,20 - 2,15	0,27	0,10 - 0,56
	Après		3,35	0,40 - 12	1,12	0,26 - 4,8
Modéré	Avant	12	0,30	0,10 - 0,80	0,20	0,05 - 0,35
	Après		0,90	0,20 - 2,70	0,35	0,10 - 0,60

T A B L E A U N° XIX

ination de la tréhalase dans l'urine, avant un effort violent et longé, aussitôt après et après 2 h 30 de repos (chez un même sujet)

	Série d'essais	Avant effort	Aussitôt après effort	Après 2 h 30 de repos
U.Tr.	a	0,30	6,4	0,35
	b	0,35	5,6	0,60
	c	0,50	3,0	0,70
U.Tr. / Créatinine/l	a	0,30	4	0,27
	b	0,29	1,86	0,23
	c	0,30	1,3	0,32
Protéinurie (en g/l)	a	0	0,33	0
	b	0	0,47	0
	c	0	0,15	0

Il n'y a aucune corrélation entre l'augmentation la tréhalase urinaire et la protéinurie physiologique qui paraît parfois au cours de l'effort.

L'élimination de la tréhalase urinaire revient à valeur normale après 2 h 30 de repos.

Nous avons alors comparé d'une manière statistique résultats obtenus.

a) Comparaison des résultats obtenus avant et après un effort physique

Si l'on compare l'élimination urinaire de la tréhalase chez un même sujet avant et après un effort physique modéré (tableau XVIII, paragraphe I), l'on remarque une augmentation de cette élimination après effort ; la différence entre les valeurs n'est cependant pas significative. Par contre, si l'effort est intense, que sa durée dans le temps soit courte ou prolongée, il existe avec l'état de repos une différence très significative dans l'élimination de la tréhalase (tableau XX, paragraphes II et III).

b) Comparaison entre les efforts physiques modérés et intenses

Il existe une différence très significative, au seuil de probabilité de 0,01 entre l'élimination urinaire de la tréhalase au cours d'un effort modéré et les efforts physiques intenses, quelle que soit la durée de ceux-ci (tableau XX, paragraphes IV et V) ; il n'en existe plus lorsque l'on compare l'élimination de la tréhalase au cours des efforts physiques intenses de courte durée et ceux qui sont intenses et prolongés (tableau XIX, paragraphe VI).

Dans tous les cas, les valeurs de la tréhalasurie sont revenues à leur valeur initiale dans les deux heures qui ont suivi l'effort.

Nous avons, par ailleurs, dosé les protéines et l'activité tréhalasique du sérum, en particulier au cours de la comparaison de l'élimination urinaire de la tréhalase chez l'individu avant et après un effort physique intense.

Elimination de la tréhalase urinaire de l'effort - Calculs statistiques : comparaison des moyennes

	Groupe	Nombre de Sujets	Moyenne logarithmique m	$m_1 - m_x = d$	σ^2	σ	Sm	Sd
I	Avant effort	12	0,374	0,046	0,0686	0,262	0,079	0,155
	Après effort modéré		0,420		0,0804	0,283	0,0854	
II	Avant effort	8	0,396	0,474	0,049	0,222	0,081	0,1278
	Après effort intense et de courte durée		0,870		0,168	0,411	0,114	
III	Avant effort	14	0,312	1,039	0,0721	0,268	0,101	0,1375
	Après effort intense et prolongé		1, 351		0,1386	0,373	0,141	
IV	Effort modéré	26		0,45	0,0804			0,144
	Effort intense de courte durée				0,168			
V	Effort modéré	20		0,931	0,0804			0,154
	Effort intense et prolongé				0,1386			
VI	Effort intense de courte durée	22		0,481	0,168			0,185
	Effort intense et prolongé				0,1386			

Quelques-uns des résultats que nous avons obtenus sont réunis dans le tableau XXI.

Nous observons une augmentation de l'ordre de 7 % en moyenne du taux des protéines, et d'environ 43 % de l'activité tréhalasique. Ces augmentations ne sont pas dûes à une hémoconcentration, le taux de l'hématocrite n'ayant pas augmenté de plus de 2 % après l'effort. Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'augmentation des protéines et celle de l'activité tréhalasique.

De plus, si nous comparons l'augmentation de l'activité tréhalasique dans le sérum à celle des urines, nous remarquons que la variation de l'enzyme sérique est très discrète. Elle est ici, de 1,2 à 1,7 fois contre une augmentation moyenne du rapport U.Tr. Urinaire / Créatinine de 12 fois (limites extrêmes : 2 à 33 fois).

T A B L E A U N° XXI

Influence d'un effort intense sur l'activité tréhalasique et les protéines du sérum sanguin

Essai	Activité tréhalasique U.Tr./litre		Protéines (g/litre)		Hématocrite	
	Avant effort	Après effort	Avant effort	Après effort	Avant effort	Après effort
1	16,7	25,0	76	86	46 %	48 %
2	17,8	21,2	75	79	47 %	47 %
3	11,5	15,4	69	75	47 %	48 %
4	6	10,3	85	85	48 %	47 %

(D) - LA CLEARANCE RENALE

Nous avons étudié parallèlement la clearance rénale de la tréhalase et de l'urée.

Les déterminations de l'épuration rénale de l'enzyme sérique ont pour but de déterminer le mode d'excrétion de l'enzyme au niveau rénal.

Sur une urine émise pendant l'intervalle d'une heure, le calcul de la clearance de la tréhalase indique pour 16 essais, des valeurs s'échelonnant de 0,01 à 0,70 (moyenne 0,21).

Les clearances de la tréhalase et de l'urée ont oscillé de façon tout à fait indépendantes. Nos résultats font l'objet du tableau XXII.

L'élimination urinaire de l'enzyme est indépendante de la teneur en tréhalase du sérum.

Nous n'avons pas noté la moindre relation entre l'activité tréhalasique et les teneurs en chlorures, créatinine et urée de l'urine.

Nos résultats font l'objet du tableau XXIII.

T A B L E A U N° XXII

Etude de la clearance de la tréhalase et de l'urée

Sujets	Clearance de la tréhalase	Clearance de l'urée (Cm%)
1	0,01	31
2	0,02	125
3	0,02	43
4	0,02	50
5	0,04	64
6	0,04	45
7	0,05	22
8	0,09	61
9	0,13	87
10	0,20	84
11	0,35	38
12	0,40	115
13	0,50	55
14	0,50	122
15	0,60	66
16	0,70	59

T A B L E A U N° XXIII

Elimination urinaire de la tréhalase - Comparaison avec celle de l'urée et des chlorures

Sujets	U.Tr.	Urée en g/l	Chlorures en mEq/l	Chlorures / U.Tr. x 100
1	0,5	16	169	2,7
2	0,6	6	45	0,9
3	0,6	14	220	3,8
4	0,6	15	157	2,6
5	0,7	10	169	2,3
6	0,7	12	180	2,7
7	0,7	14	183	2,7
8	0,7	14	253	3,8
9	0,7	16	250	3,9
10	0,7	25	234	3,5
11	0,8	10	291	3,5
12	0,9	12	126	2,7
13	0,9	13	264	3,1
14	1,0	12,5	151	0,9
15	1,0	13	236	2,5
16	1,0	16	240	2,3
17	1,2	14	307	2,6
18	1,3	17	143	1,1
19	1,5	17	275	1,8
20	1,7	16	216	1,3

(E) - ELIMINATION URINAIRE DE LA TREHALASE CHEZ LES SUJETS DIABETIQUES

Nous suivons depuis plusieurs années l'évolution de la tréhalasémie d'un sujet hypertréhalasémique décelé par GEORGET en 1962.

Ce malade diabétique élimine aussi dans ses urines de la tréhalase à un taux anormalement élevé.

Nous avons cherché à savoir si ce trouble du métabolisme glucidique exerce une influence sur la tréhalasurie. Nous avons collecté des urines de sujets diabétiques, récemment émises, que nous avons dialysées contre de l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C.

Nous avons ainsi examiné 14 urines de sujets diabétiques. L'activité tréhalasique a été rapportée à la concentration en créatinine des urines pour éviter les variations de l'excrétion de l'enzyme en fonction de la diurèse.

Lorsque l'on compare les moyennes logarithmiques des activités tréhalasiques des sujets diabétiques à celles des sujets normaux, on voit que la différence des moyennes $m_1 - m_2$, bien supérieure à 2,6 Sd est très significative.

T A B L E A U N° XXIV

Elimination de la tréhalase urinaire de sujets normaux et diabétiques : Calcul statistique - comparaison des moyennes

	Nombre de Sujets	Moyenne arithmétique $\frac{\text{U. Tr.}}{\text{créatinine}}$	Moyenne logarithmique m	σ^2	σ	$m_1 - m_2 = d$	Sd
nes uales	77	0,433	0,588	0,0459	0,214	0,969	0,0709
nes étiques	14	4,4	1,527	0,1227	0,350		

On peut conclure que l'activité de la tréhalase urinaire est supérieure chez le diabétique à celle des sujets normaux.

- ° -

Chapitre III - ACTION DE DIVERS EFFECTEURS DES TREHALASES SERIQUE ET URINAIRE DE L'HOMME

Au cours de travaux antérieurs, DEMELIER (30) et LABAT (55) ont montré que divers effecteurs ont inhibé les tréhalases du rein et de l'intestin de l'Homme et du Porc. Ce sont le saccharose, le phloridzoside et le phlorétol. Par contre, le naringoside est resté sans action.

Nous avons étudié le comportement des tréhalases sérique et urinaire vis à vis du saccharose, du phloridzoside, du phlorétol et du naringoside. Pour cela, nous avons introduit dans le milieu des doses constantes d'effecteurs.

Nous avons utilisé des concentrations moléculaires décroissantes en tréhalose de M/20 à M/320 dans le milieu à 37° et à pH 5,7.

Nos résultats sont représentés sur la figure 16 selon le mode de représentation de LINEWEAVER et BURK de 1/V en fonction de 1/S en présence et en absence d'effecteur.

Nous avons ensuite calculé la constante de dissociation du composé enzyme-inhibiteur KI.

Nous avons appliqué la formule suivante , les inhibitions étant de type compétitif :

$$KI = \frac{i}{\frac{Kp}{Km} - 1}$$

i : la concentration en inhibiteur dans le milieu exprimée en moles,

Kp : la constante de dissociation du composé enzyme-substrat en présence de l'inhibiteur,

Km : la constante de MICHAELIS.

1°) - Inhibition par le saccharose

A la concentration M/40 dans le milieu, le accharose exerce une forte inhibition sur les tréhalases sérique t urinaire.

Nous avons étudié cette inhibition en fonction de la oncentration en saccharose du milieu que nous avons fait varier e M/320 à M/20.

Nos résultats sont représentés sur la figure 15 ; nous vons porté en abscisses les molarités en saccharose dans le ilieu, et en ordonnées les pourcentages d'inhibition.

L'inhibition est fonction de la concentration en accharose du milieu réactionnel.

Dans le cas des urines, où il existe une activité ucrasique, nous avons effectué une détermination de cette ctivité, parallèlement aux divers essais et nous en avons etranché la valeur de celle de l'essai contenant le mélange accharose + tréhalose. Cette activité "sucrasique" est d'ailleurs elativement faible dans le cas d'urines concentrées à 4°C.

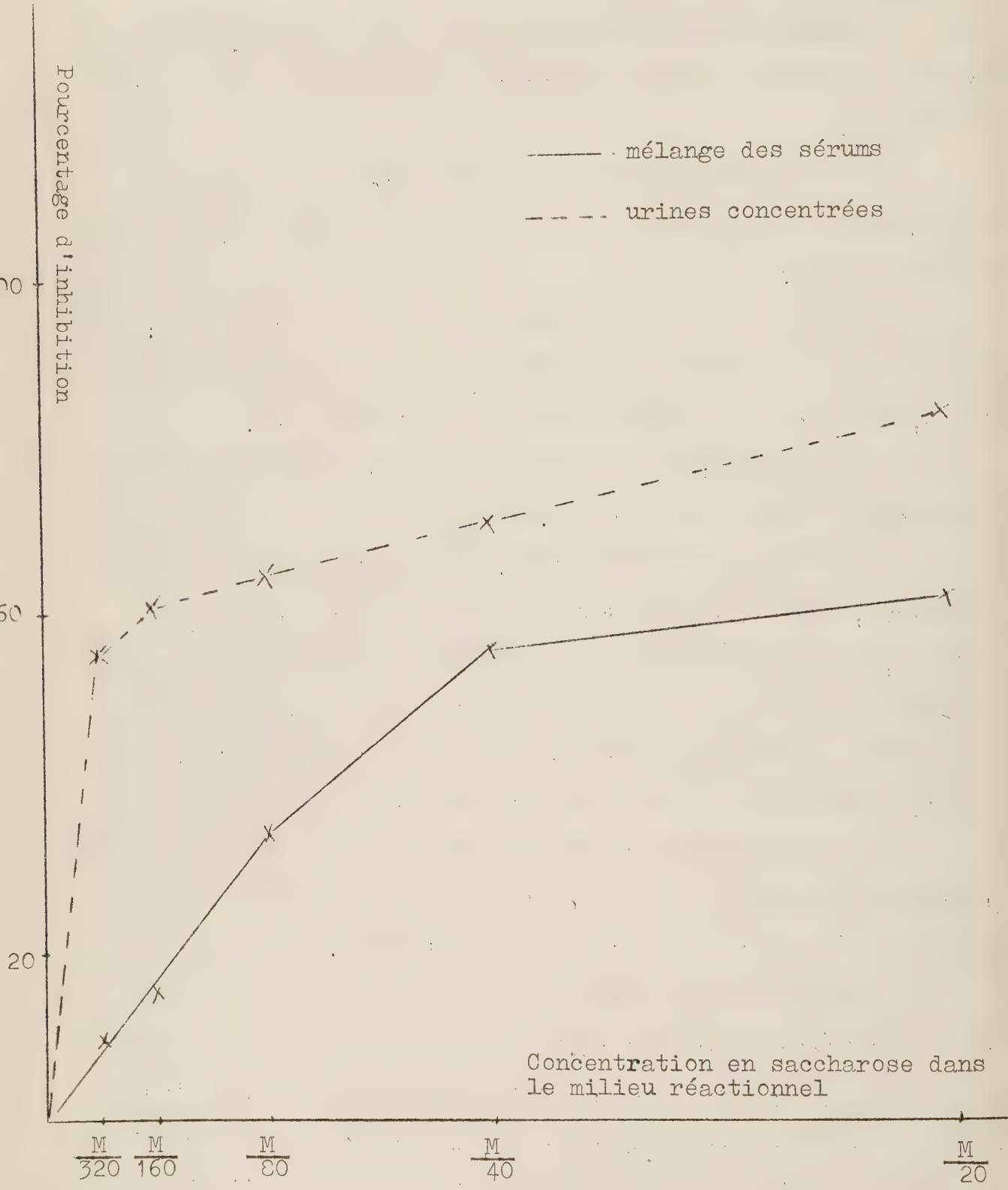
Le saccharose inhibe beaucoup plus les tréhalases de 'urine que celles des sérums où il semble que les protéines ouent un rôle protecteur vis à vis de l'enzyme.

La figure 16 montre que le saccharose se comporte omme un inhibiteur compétitif.

Les inhibiteurs compétitifs sont très souvent des orps à structure proche de celle du substrat ou de ses produits e transformation. Comme son nom l'indique, ce type d'inhibition e présente comme une compétition entre le tréhalose et le accharose au niveau de site de fixation de l'enzyme.

Figure n° 15

Inhibition des tréhalases du sérum et de l'urine par le saccharose

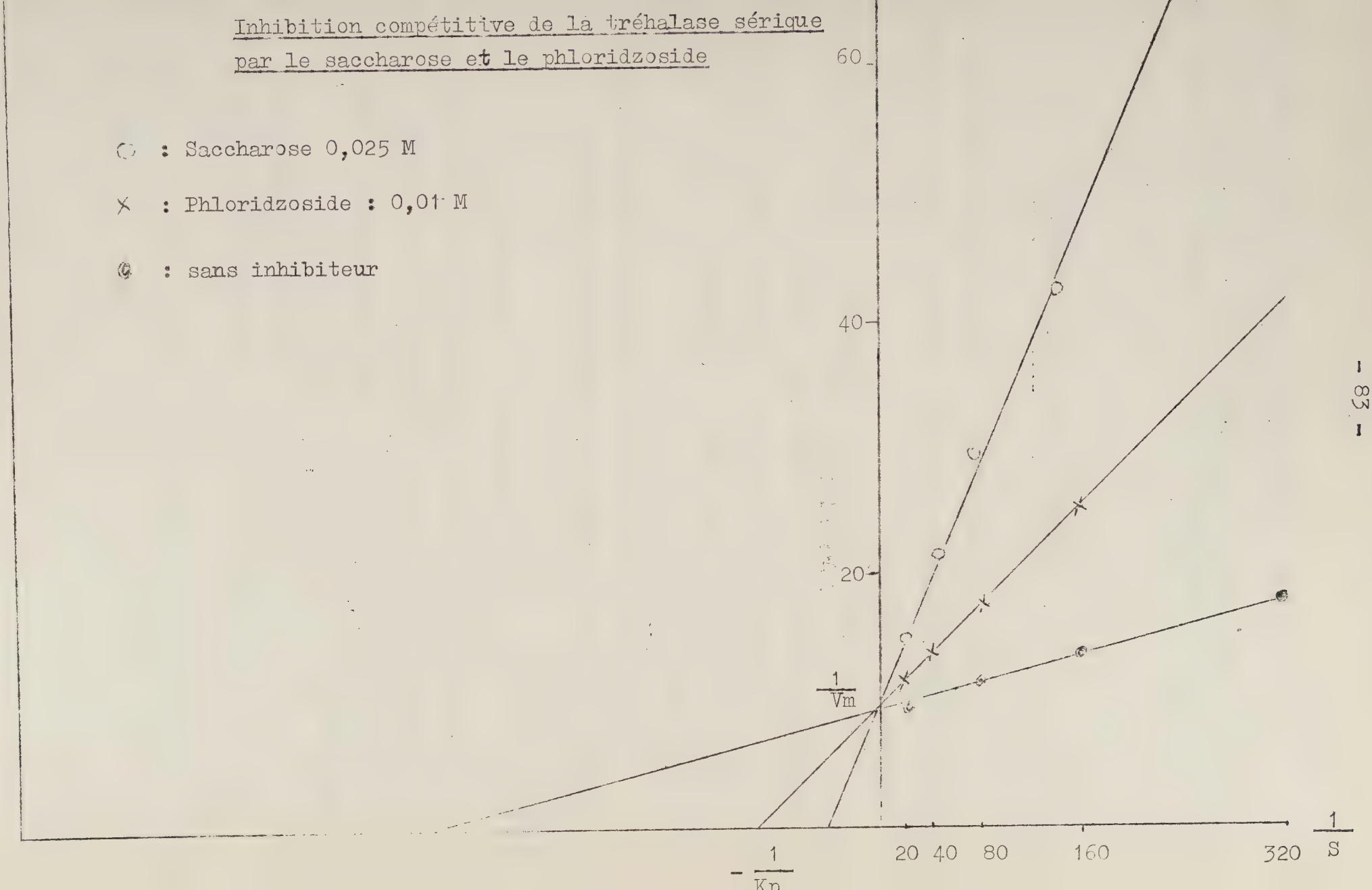


Inhibition compétitive de la tréhalase sérique par le saccharose et le phloridzoside

○ : Saccharose 0,025 M

× : Phloridzoside : 0,01 M

◎ : sans inhibiteur



Il semble donc que le saccharose possède une structure qui lui permet de se combiner avec l'enzyme et d'inhiber l'hydrolyse du tréhalose.

2°) - Inhibition par le phloridzoside

A la concentration M/100 dans le milieu réactionn le phloridzoside exerce une forte inhibition sur les tréhalases sérique et urinaire.

Cette inhibition augmente lentement avec une concen tration croissante en phloridzoside (figure 17).

Comme le saccharose, le phloridzoside se comporte comme un inhibiteur compétitif des tréhalases sérique et urinaire (figure 16).

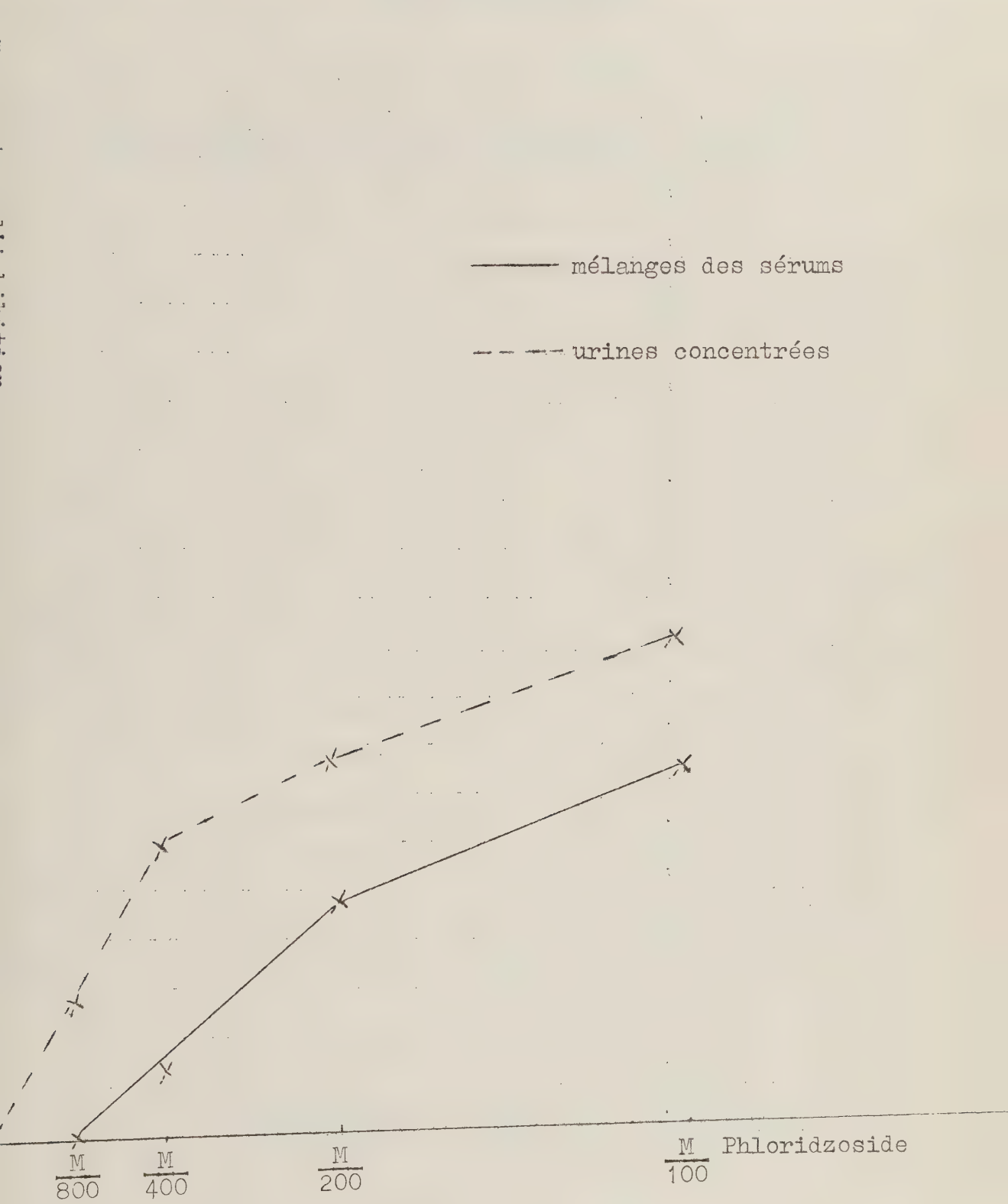
Cette inhibition se retrouve avec tous les sérums examinés comme le montrent les chiffres rassemblés dans le tableau XXV.

Le pouvoir inhibiteur du phloridzoside est supérieur à celui du saccharose. Ainsi, les pourcentages d'inhibition par le saccharose varient de 11 à 48 % avec divers sérums ; la moyenne est 27 %. Alors que, en présence de phloridzoside, ils s'échelonnent de 14 à 50 % ; la moyenne est 36 %.

Comme dans le cas du saccharose, la tréhalase urinaire est inhibée de façon plus accentuée que la tréhalase sérique.

Figure n° 17

nhibition des tréhalases du sérum et de l'urine par le phloridzoside



T A B L E A U N° XXV

Inhibition des tréhalases sériques par le saccharose et le phloridzoside

Sujet	U. Tr.	Pourcentage d'inhibition	
		Saccharose M/40	Phloridzoside M/100
1	3,1	20	20
2	3,6	29	28
3	3,9	20	40
4	4,3	20	44
5	5,1	13	35
6	6,0	18	14
7	6,3	11	40
8	6,5	19	50
9	8,9	25	27
10	9,7	38	47
11	9,9	48	39
12	10,5	20	50
13	11,0	27	24
14	11,1	20	45
15	12,2	44	44
16	12,4	34	39
17	15,6	42	37
18	16,3	26	37
19	16,7	20	25
20	16,8	29	27

Nous avons reporté dans le tableau XXVI les valeurs s KI que nous avons obtenues au cours de nos divers essais.

T A B L E A U N° XXVI

Valeurs des Km et KI des tréhalases sérique et urinaire en présence de saccharose et de phloridzoside

		Saccharose M/40	Phloridzoside M/100
	Km	KI	KI
ne concentrée	$3,3 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
rum	$2,7 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$
anges de sérums	$2,5 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$
anges de sérums	$2,7 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	$3,7 \times 10^{-3}$
anges de plasmas	$2,5 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$

Si on compare les valeurs des Km trouvées aux KI orrespondants, on s'aperçoit qu'il y a une grande dispersion de I ; la dispersion de KI en présence de saccharose est beaucoup lus grande que celle de KI en présence du phloridzoside.

3°) - Inhibition par différents hétérosides

L'importante inhibition de la tréhalase par le hloridzoside nous a amenée à étudier le comportement de cette

enzyme vis à vis d'analogues structuraux du phloridzoside : le phlorétol d'une part, et le naringoside d'autre part.

Ces hétérosides possèdent une aglycone dérivant des chalcones ou des flavanones. Ces dernières différent de la structure des chalcones par élimination de deux atomes d'hydrogène et cyclisation.

Les structures des dihydro-chalcones et des flavanones font l'objet de la figure 18 où nous représentons les formules des différents hétérosides obtenus en fonction des substitutions des hydrogènes.

Tous les différents effecteurs étaient, quand leur solubilité le permettait, à la concentration de M/100 dans le milieu.

La tréhalase sérique n'a pas été inhibée par le phlorétol à la différence de la tréhalase urinaire. Nous avons pensé à un rôle possible des protéines sériques dans cette absence d'inhibition de l'enzyme sérique par le phlorétol.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps, ajouté des protéines sériques à une préparation purifiée de tréhalase de rein de Porc,* et observé son comportement vis à vis du phlorétol dans ces conditions. L'inhibition est 3,5 fois plus élevée en l'absence de protéines.

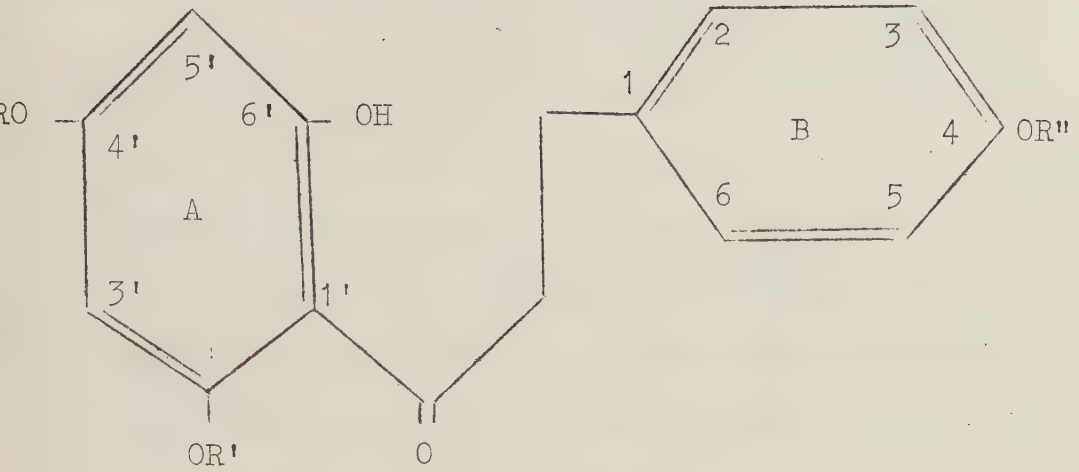
Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une purification de l'enzyme sérique par électrophorèse préparative sur un appareil Spinco, modèle C.P. de la maison Beckmann.

Une grande partie des protéines sériques sont éliminées par cette méthode à la suite de cette purification.

---

* Nous remercions Mademoiselle LABAT qui nous a fourni cette préparation.

Figure n° 18



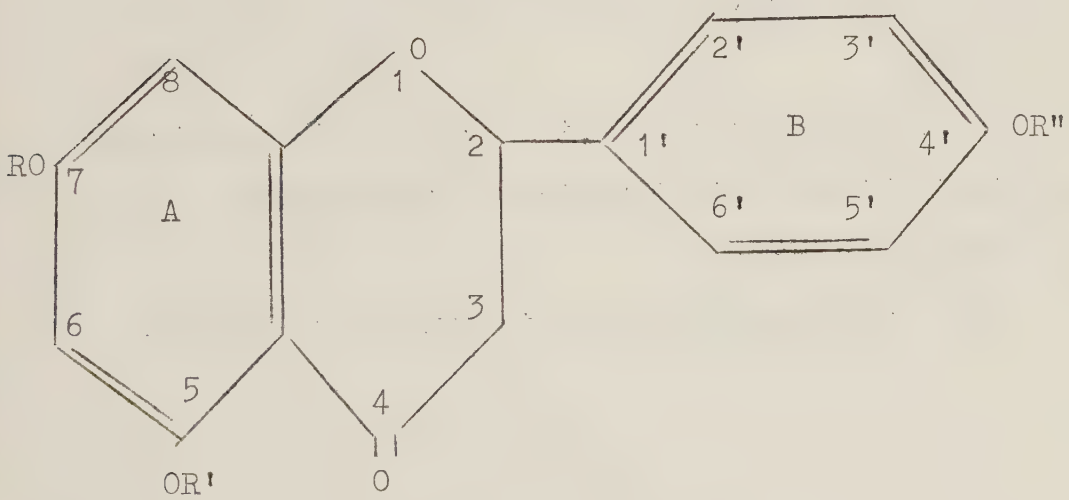
dihydro-chalcones

- Phlorétol

R	H
R'	H
R"	H

- Phloridzoside

R	H
R'	β glc
R"	H



Flavanones

- Naringoside

R	∝ 1 rhamnosido-1-2-D-glucosyl
R'	H
R"	H

La tréhalase sérique a été inhibée par le phlorétol. L'inhibition est de l'ordre do 56 % (valeur moyenne de 2 dosages).

Les protéines sériques paraissent donc jouer un rôle protecteur de l'enzyme vis à vis du phlorétol.

Si l'on compare l'action du phlorétol et celle du phloridzoside, l'aglycone a une action inhibitrice beaucoup plus élevée (de l'ordre de 136 fois) sur les tréhalases sériques purifiées et 150 fois pour les tréhalases urinaires.

L'enzyme urinaire est la plus sensible à l'action des effecteurs, probablement parce qu'elle est présente dans un milieu dépourvu de protéines protectrices.

Par contre, le naringoside, appartenant au groupe des flavanones n'a pas exercé d'action inhibitrice sur les tréhalases étudiées.

Ce résultat est à rapprocher de ceux que LABAT et coll. (55) ont obtenus en étudiant l'action de composés appartenant au groupe des chalcones et des flavanones sur les tréhalases rénale de l'Homme et du Porc et de l'intestin de Porc.

Tout se passe comme si la cyclisation en flavanone supprimait l'action inhibitrice de ces substances sur l'enzyme sérique et urinaire.

Nos résultats font l'objet du tableau XXVII.

T A B L E A U N° XXVII

Action de différents effecteurs sur des tréhalases sérique et urinaire

(Les chiffres du tableau indiquent les pourcentages d'inhibition à pH 5,7 et 37°)

Hétérosides ou aglycones	Concentration dans le milieu	Sérum sanguin	Urine
Phlorétol	0,00014 M	56 *	83
Phloridzoside	0,01 M	41	56
Naringoside	0,01 M	0	0
Saccharose	0,01 M	31	63

* L'action inhibitrice du phlorétol ne s'est révélée qu'après purification sommaire de l'enzyme sérique.

- ° -

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_

Le but de notre travail était d'étudier les tréhalases sérique et urinaire afin de les individualiser éventuellement des tréhalases de Mammifères étudiéesà ce jour (30) (55) (32) (21) (56) (31) (19) (20) et tenter de préciser leur origine. Nous avons donc défini quelques propriétés générales de ces enzymes.

Les tréhalases du sérum et de l'urine présentent un maximum d'activité à pH 5,7 et des valeurs de la constante de Michaelis du même ordre de grandeur.

Le pH optimum et la constante de Michaelis des tréhalases sérique et urinaire sont analogues à ceux de la tréhalase rénale humaine.

Les valeurs très faibles des constantes de Michaelis montrent la grande affinité des tréhalases des Mammifères pour le tréhalose.

Les résultats groupés dans le tableau XXVIII montrent que le pH optimum des enzymes humaines et celui des enzymes de Mammifères sont très proches. Il en est de même de leurs constantes de Michaelis déterminées au pH optimum.

Nous rappellerons également que lors de l'étude du Km, notamment par la représentation de HOFSTEE (51), tout se passe comme s'il n'existait qu'une seule enzyme agissant sur le tréhalose dans le sérum.

Les tréhalases de Mammifères, par contre, se différencient de tréhalases d'autres origines.

T A B L E A U N° XXVIII

Comparaison du pH optimum et de la constante de Michaelis de quelques tréhalases humaines et de Mammifères

Origine de l'enzyme	pH optimum	Km
Sérum humain	5,7	1,8 à 3,0 x 10^{-3}
Urine humaine	5,6 - 5,8	2,3 à 6,0 x 10^{-3}
Rein humain	5,7 - 5,8	3 x 10^{-3}
Rein de Lapin	6,3	3,5 x 10^{-3}
Rein de Porc	5,7	5,0 x 10^{-3}
Intestin de Porc	6,0	5,4 x 10^{-3}

Nous citerons par exemple, la tréhalase de la mouche Sarcophaga barbata (14) ; deux types de tréhalases ont été trouvées par électrophorèse dans les muscles moteurs de vol de ce Diptère.

L'hydrolyse est assez rapide pour l'enzyme sérique, lente pour l'enzyme urinaire.

La tréhalase semble être une enzyme fort stable. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'inhibiteurs dialysables de la tréhalase dans le sérum humain.

Les tréhalases du sérum et de l'urine sont assez thermostables puisqu'elles conservent toute leur activité après chauffage de 10 minutes à 50° et ne sont totalement inactivées que vers 60°.

Les tréhalases du rein d'Homme, rein de Porc et Intestin de Porc sont encore plus thermostables (30) (55) puisque l'inactivation n'est totale que vers 70°.

Les tréhalases des Mammifères sont également plus thermostables que celles de Pseudomonas (1) et de levure (54) qui sont inactivées vers 40°.

La tréhalase sérique conserve son activité après plusieurs jours à 37° (43).

L'activité tréhalasique urinaire ne varie pas si les urines sont conservées 48 heures à 4°.

A - Sérum

La tréhalase est la seule disaccharidase présente régulièrement dans le sérum humain (43) (18) (86).

Chez l'enfant (17), l'activité augmente régulièrement avec l'âge depuis la naissance pour atteindre le taux de l'adulte entre 6 et 11 ans.

L'activité sérique moyenne de 115 déterminations était 25,5 U.Tr. Il existe de nettes variations de la tréhalasémie chez les sujets normaux, les valeurs s'étagent de 2,3 à 75 U.Tr.

Nous n'avons pas trouvé de variations significatives en fonction des groupes sanguins à la différence de EZE et coll. (40) pour lesquels cette influence est faible mais significative.

Par contre, l'influence de la race nous parait profonde. Nous avons trouvé que les Africains de race négroïde

ont une valeur moyenne de la tréhalase 2 fois plus basse que celle des blancs. Les valeurs s'échelonnent de 1 à 42 U.Tr. chez les Africains noirs ; la moyenne générale de 104 déterminations est de 9,3 U.Tr.

L'activité moyenne des sérums d'Hommes est légèrement supérieure à celle des sérums de Femmes du même groupe d'âge (43) (40), mais la différence des moyennes de deux sexes est purement fortuite.

Tous les auteurs sont d'accord pour observer des écarts assez nets d'activité d'un sujet à l'autre. C'est ce qui rend assez difficile l'expression d'un taux moyen. L'on ne pourra considérer comme anormales que des variations importantes par rapport à la moyenne.

Par contre, chez le même sujet, le taux de la tréhalase sérique demeure assez stable (88).

L'origine de la tréhalase sérique n'a pas encore été précisée de façon définitive.

L'intestin semble être pour SACKTOR à l'origine de la majeure partie de l'enzyme sérique. Cependant, l'étude comparée de l'activité intestinale et sérique chez le foetus et le jeune enfant d'une part et chez un sujet hypertréhalasémique d'autre part, a conduit DEMELIER (30) a conclure que l'origine intestinale de la tréhalase sérique était peu probable. BERGOZ (5) a décrit récemment une intolérance digestive aux champignons par déficit en tréhalase intestinale chez une malade de 71 ans. Mais, à notre connaissance l'activité tréhalasique sérique de cette malade n'a pas été déterminée.

Une origine rénale de la tréhalase est possible ; DEMELIER (30) a observé que tous les Mammifères étudiés possèdent une activité tréhalasique rénale très importante. Seul, le Rat, ne possède pas de tréhalase dans son équipement enzymatique rénal, or, son activité tréhalasique sérique est nulle ou très faible.

Chez l'Homme, il a régulièrement trouvé une activité tréhalasique élevée dans le rein.

L'étude de la tréhalasémie chez les sujets binéphrectomisés montre bien que la majeure partie de l'enzyme sérique n'est pas d'origine rénale (35).

Une fraction importante de la tréhalase semble provenir du foie : l'on assiste à une baisse très significative de l'enzyme au cours de nombreuses affections hépatiques dans lesquelles il existe une atteinte importante du parenchyme de cet organe. On note, d'autre part, une forte augmentation de la tréhalasémie chez les sujets atteints d'obstructions des voies biliaires principales et présentant un syndrome rétentionnel (43) (30) (61).

La bile humaine renferme, en effet, de la tréhalase (61) (19) et semble être une voie d'élimination de cette enzyme.

Outre ces hypertréhalasémies mises en évidence dans les cas d'obstruction biliaire, un chercheur de notre laboratoire a découvert en 1962, une forte augmentation de la tréhalase sérique chez une diabétique d'origine antillaise (43).

Notre équipe de recherche a pu obtenir de nombreux échantillons de sang de ce sujet et montrer que sa tréhalasémie

oscillait aux environs de 80 U.Tr. Elle se maintenait ainsi à un taux constamment élevé depuis 8 ans. Mais depuis un an, on peut noter un abaissement net et assez constant de sa tréhalasémie ; or, depuis cette époque, cette malade présente une cirrhose décompensée avec atteinte cellulaire importante. Le taux de la tréhalase est indépendant de sa glycémie et son diabète ne parait présenter aucune caractéristique particulière.

Ceci nous a incitée à examiner divers diabétiques (19) (43) (22). Nous avons observé une certaine tendance à une légère augmentation de la tréhalase urinaire chez quelques uns des diabétiques.

Récemment, EZE et EVANS (39) ont signalé que l'activité de la tréhalase plasmatique était légèrement supérieure dans un groupe de diabétiques à celle d'un groupe de sujets sains.

Les variations du taux de la tréhalase dans le sérum ne paraissent pas être reliées selon les cas, soit à la présence d'un inhibiteur, soit à celle d'un activateur.

Nous avons, en effet, trouvé que les coupages de sérums normaux par des sérums de cirrhotiques ou de sujets hypertréhalasémiques ont conduit à des valeurs de la tréhalase correspondant à celles calculées selon les proportions respectives des sérums normaux ou pathologiques qui étaient mélangés (61) (33) (88) (39).

B) - Urine

L'urine humaine renferme régulièrement la tréhalase.

Comme pour la tréhalase sérique, il existe de nettes variations de l'activité entre les différents sujets.

L'élimination urinaire de l'enzyme est indépendante de la teneur en tréhalase du sérum ; la mesure de la clearance conduit en effet à des valeurs s'échelonnant de 0,01 à 0,6. D'autre part, il n'y a aucune corrélation entre les activités de la tréhalase urinaire et la teneur de l'urine en chlorures, urée et créatinine.

Le rapport U.Tr./créatinine (en g par litre) a oscillé entre 0,17 et 9,0 pour des échantillons d'urines rassemblés pendant 24 heures ; il s'est situé entre 0,15 et 7,7 pour diverses fractions émises au cours de la journée. Ces résultats montrent que la tréhalase urinaire ne provient pas d'une simple filtration glomérulaire de l'enzyme sérique.

Les résultats obtenus tendent simplement à retenir comme des plus probables que la majeure partie de la tréhalase du sérum provient du foie et que la majeure partie de la tréhalase urinaire provient des tubules rénaux.

Il n'a pas été observé pour la tréhalase, de variation significative de l'élimination urinaire en fonction du sexe, ni du rythme circadien.

Cette enzyme se comporte ainsi comme un certain nombre d'autres enzymes urinaires précédemment étudiées par WERNER et coll. (90): leucine amino peptidase, lactico déshydrogénase, arylsulfatase, phosphatases acide et alcaline, β glucuronidase.

Le comportement de la tréhalase sérique au cours de l'effort semble de même comparable à celui d'enzymes

précédemment étudiées : nous citerons, par exemple, la lactico déshydrogénase et ses iso-enzymes (66) (8), les transaminases glutamique-oxalacétique, glutamique-pyruvique, la créatine phosphokinase (8).

Les divers auteurs ont remarqué les faibles variations présentées par les valeurs de l'hématocrite au cours de ces études ; l'hémoconcentration ne peut donc être qu'un facteur mineur dans les changements observés. Ces augmentations sont d'importance variable selon les sujets et selon l'enzyme étudiée. Elles ont tendance à s'annuler plus ou moins rapidement après une période de repos.

Elles sont principalement d'origine musculaire ou hépatique. Au cours de l'effort, il a été noté une augmentation considérable de l'activité aldolasique, de la malico-déshydrogénase, de la créatine phosphokinase dans le muscle (79) ; des augmentations de la transaminase glutamique-oxalacétique (26), de la malicodéshydrogénase (78) ont été observées dans le foie.

D'autres organes, comme le rein, pourraient intervenir dans ces augmentations, mais de façon mineure. Le mécanisme du passage de ces enzymes dans le sérum serait dû, non pas à un changement histologique cellulaire, mais à un changement de perméabilité des cellules (41).

Au cours de l'étude de la répartition de la tréhalase dans les tissus et organes des Mammifères (19), cette enzyme a été localisée dans le foie, où elle est liée à la membrane de l'endoplasme (84), dans l'intestin grêle et surtout dans le rein où elle se trouve dans les cellules de la bordure en brosse (4) (3). A notre connaissance, elle n'a jamais été

mise en évidence dans le muscle.

Chez le sujet en bonne santé, il est des plus probable que la tréhalase sérique est en grande partie d'origine hépatique. Au cours de l'effort, il pourrait y avoir, comme pour la transaminase glutamique-oxalacétique, la malicodéshydrogénase, une augmentation de l'activité tréhalasique du foie et passage de l'enzyme dans le sang. Cette augmentation, quoique nette, est faible si on la compare à l'augmentation de la tréhalase dans les urines.

Dans les urines du sujet en bonne santé, l'on trouve des protéines d'origine plasmatique et des protéines d'origine tissulaire (rein, tractus urinaire ....). POORTMANS et JEANLOZ ont pu montrer qu'après l'effort, il y avait un accroissement des protéines d'origine plasmatique, alors que les protéines d'origine tissulaire étaient excrétées à la même vitesse (73). L'exercice pourrait provoquer un changement dans la perméabilité glomérulaire.

Il parait ainsi très probable qu'une partie de la tréhalase sérique passe dans les urines au cours de l'effort. Cependant, nous pensons qu'il est possible de prévoir une autre cause à l'augmentation considérable de l'activité tréhalasique des urines par rapport à celle du sérum, au cours de l'effort.

Parmi les organes contenant de la tréhalase, le rein est, de loin, le plus riche. Son activité est 60 fois supérieure à celle du foie. Elle est, en moyenne, de 1 280 U.Tr./Kg pour une activité moyenne du foie: 20 U.Tr./Kg.

De plus, nous avons précédemment observé par des études de clearance de l'enzyme, qu'il n'y a, chez le sujet au repos aucun rapport entre l'activité tréhalasique sérique et celle des urines (31) (20).

Bien qu'il n'y ait probablement pas de relation entre ce qui se passe au repos et après un effort, nous pensons que la plus grande partie de l'activité tréhalasique urinaire est vraisemblablement d'origine rénale.

L'étude de la répartition de l'enzyme dans les organes et tissus des Mammifères permet d'éliminer toute participation musculaire.

La tréhalase se différencie ainsi des autres enzymes étudiées à ce jour, dont l'origine musculaire est loin d'être négligeable.

De plus, la tréhalase occupe dans le rein une position relativement externe. BERGER et SACKTOR (4), ont pu la localiser dans les cellules de la bordure en brosse du rein de Lapin. Il n'est pas impossible qu'au cours de l'effort, il y ait une irritation de ces cellules, conduisant à une lyse et à la mise en liberté de la tréhalase. Ceci pourrait expliquer la disproportion entre l'augmentation de l'activité tréhalasique sérique (1,5 fois en moyenne) et celle des urines (12 fois en moyenne , avec des extrêmes allant de 2 à 33 fois les valeurs exprimées sous la forme du rapport U.Tr./créatinine).

Comme toutes les tréhalases de Mammifères étudiées à ce jour, les tréhalases sérique et urinaire ont été inhibées par le saccharose. Cette inhibition est vraisemblablement due à l'analogie de structure de ce disaccharide avec le tréhalose.

Au cours de travaux antérieurs (21) (32)(55) (31),

il avait été constaté que les tréhalases rénale et sérique étaient fortement inhibées par le phloridzoside. Cet hétéroside, β-glucoside d'une dihydrochalcone, est connu pour provoquer une glycosurie par inhibition de la réabsorption tubulaire.

La tréhalase rénale est localisée au niveau des tubules rénaux. Il est possible que la tréhalase intervienne dans la résorption rénale du glucose par un mécanisme non encore élucidé.

Nous avons étudié plus en détail le comportement des tréhalases sérique et urinaire en présence du phloridzoside, de son aglycone le phlorétol et du naringoside dont la structure est proche de celle des dihydrochalcones, la différence portant sur une cyclisation en flavanone.

Nous avons groupé dans le tableau XXIX les résultats obtenus avec les sérums et les urines humaines et ceux que LABAT et DEMELIER (55) ont obtenu avec les tréhalases du rein d'Homme et du rein et intestin de Porc.

Les enzymes sérique et urinaire sont inhibées par le phloridzoside ; cette inhibition est dans les deux cas, typiquement compétitive. Le même type d'inhibition est observé avec l'enzyme rénale de l'Homme.

Les expériences décrites ci-dessus avaient pour but de chercher à individualiser les tréhalases de Mammifères. Elles ont au contraire mis en évidence leur étroite analogie de comportement.

Ces tréhalases, par contre, se différencient de tréhalases d'autres origines. Nous citerons par exemple les tréhalases du Hanneton (47) et de Pseudomonas fluorescens (1) qui ne sont pas inhibées par le phloridzoside et le saccharose,

qui inhibe par contre celle de trois insectes : Hyalophora-cecropia (50), Blaberus discoidalis (44) et de la glande labiale de Formica polyctena (71).

Le phlorétol provoque une inhibition du même type mais beaucoup plus intense, compte tenu de sa faible solubilité. Il faut noter que cette inhibition n'a pu être mise en évidence avec la tréhalase sérique qu'après purification partielle de cette enzyme par électrophorèse préparative.

L'absence d'inhibition avant purification est vraisemblablement due à l'adsorption du phlorétol sur les protéines sériques que nous avons éliminées. Nous n'avons obtenu aucune inhibition des tréhalases sérique et urinaire par le naringoside ; cet hétéroside n'avait pas inhibé non plus les tréhalases rénale et intestinale (21) (32) (55) (56).

Les tréhalases du foie (85), du sérum, du rein, du liquide d'ascite (61) et de l'urine d'Homme (31), de l'intestin de Porc (31), ont des comportements similaires vis à vis des effecteurs étudiés.

Il n'est donc pas possible d'utiliser ces effecteurs pour rechercher l'origine de l'enzyme sérique. MASSARI (61) a ainsi observé que la faible activité tréhalasique des sérums de cirrhotiques étaient inhibée par le saccharose et le phloridzoside d'une façon similaire à celle de sérum à teneur normale en tréhalase.

C O N C L U S I O N S

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

Nous avons étudié les activités tréhalasiques sériques et urinaires. Pour le sérum, nous avons modifié le protocole établi précédemment par GEORGET (12) ; nous avons augmenté le pH de la solution tampon acétique et la concentration en tréhalose du milieu. Nous avons diminué le temps d'hydrolyse. Nous décrivons pour le sérum et l'urine, des protocoles de dosage dont nous avons vérifié la fiabilité.

Les sérums humains possèdent régulièrement une nette activité tréhalasique. Les urines humaines renferment aussi régulièrement une tréhalase de faible activité.

Quel que soit le tampon utilisé, les pH optimum de la tréhalase sérique et urinaire sont identiques. Il en est de même de leurs constantes de Michaelis déterminées au pH optimum.

Quelle que soit l'activité tréhalasique sérique et urinaire, la courbe de l'inactivation thermique de l'enzyme présente la même allure : inactivation légère de l'enzyme dès 50° qui devient totale à 60° ; les tréhalases sérique et urinaire sont assez thermostables.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'inhibiteur dialysable de la tréhalase dans le sérum humain.

La tréhalase sérique est une enzyme fort stable dans les conditions habituelles de conservation. La stabilité de la tréhalase ne semble pas résulter d'un rôle protecteur des autres

fractions protéiques du sérum.

Pour le sérum et l'urine, la relation entre le pourcentage de substrat hydrolysé et le temps est linéaire pendant au moins 6 heures.

L'activité tréhalasique ne varie pas si les urines sont conservées 48 heures à 4°.

L'erreur de la méthode proposée, exprimée en coefficient de variation a été de 1,27 % pour les sérums et 2,06 % pour les urines.

Les activités de la tréhalase sérique et urinaire se répartissent selon des distributions log-normales.

Chez des donneurs européens en bonne santé, la moyenne générale de la tréhalase sérique de 115 sujets est 25,5 U.Tr. et celle de la tréhalase urinaire de 80 sujets est de 0,61 U.Um.

Les différences observées entre les activités tréhalasiques des sujets sains en fonction de leur groupe sanguin sont fortuites.

L'activité de la tréhalase sérique des donneurs de race noire est significativement plus faible que celle des sujets de race blanche.

L'examen statistique de l'élimination urinaire de la tréhalase humaine n'indique pas d'influence significative du sexe ou du rythme circadien.

L'activité tréhalasique a été rapportée à la concentration en créatinine afin d'obvier aux variations de l'excrétion de l'enzyme en fonction de la diurèse.

Un effort physique intense s'accompagne d'une faible élévation du taux de la tréhalase sérique et d'un accroissement considérable dans les urines. La tréhalasurie retourne à la

normale après deux heures de repos. Dans ce cas, une origine rénale de la majeure partie de la tréhalase apparait être des plus probables.

Les tréhalases sérique et urinaire humaines ont des comportements similaires vis à vis des effecteurs.

Le saccharose et le phloridzoside, hétéroside d'une dihydrochalcone, ont fortement inhibé les tréhalases sérique et urinaire. Cette inhibition est, dans les ceux cas, typiquement compétitive.

L'aglycone du phloridzoside, le phlorétol, a fortement inhibé les tréhalases sérique et urinaire.

Un hétéroside de flavanone, le naringoside, n'a inhibé aucune des deux tréhalases.

L'enzyme urinaire est la plus sensible à l'action des effecteurs, probablement parce qu'elle se trouve dans un milieu dépourvu de protéines protectrices.

L'étude des variations de l'activité tréhalasique sérique et urinaire dans différentes circonstances ne permet pas pour le moment, d'affirmer de façon irréfutable l'origine de ces enzymes.

Les résultats tendent simplement à retenir, comme des plus probables, que la majeure partie de la tréhalase du sérum provient du foie et que la majeure partie de la tréhalase urinaire provient des tubules rénaux.

Il demeure donc un large champ d'investigation pour préciser l'origine et les variations pathologiques de la tréhalase du sérum et de l'urine.

- -

B I B L I O G R A P H I E

_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_o_

1. ARCILA, M.A., GUILLOUX, E. et COURTOIS, J.E. -
C. R.Ac. Sc., 1968, 267, 1779.

2. AUGUSTINSSON, K.B. -
Acta. Physiol. Scand., 1948, 15e suppl., 52.

3. BENSON, R.L., SACKTOR, B. et GREENAWALT, J.W. -
J. Cell. Biol., 1971, 48, 711.

4. BERGER, S.J. et SACKTOR, B. -
J. Cell. Biol., 1970, 47, 637.

5. BERGOZ, R. -
Gastroenterology, 1971, 60, 909.

6. BIRCH, G. -
Adv. Carbohydr. Chem., 1963, 18, 201.

7. BIRCH, G. et RICHARDSON, A.C. -
Carbohydr. Res., 1968, 8, 411.

8. BLOCK, P., VAN RIJMENANT, M., BADJOU, R., VAN MELSEN, A.Y. et VOGELEER, R. -
in POORTMANS, J.R. ed. Biochemistry of exercise
Proceedings of the 1st Int. Symp. on exercise Biochemistry, Brussels, 1968, Karger ed. Basel, 1969, p.259.

9. BOURQUELOT, E. -
C. R. Ac. Sc., 1893, 116, 826.

10. BRACONNOT, H. -
Ann. Chim., 1813, 80, 272.

11. CAMARA, A.A., ARN, K.D., REIMER, A. et NEWBURGH, L.H. -
J. Lab. Clin. Med., 1951, 37, 743.

12. CHATTAWAY, F.W., HULLEN, R.P. et ODDS, F.S. -
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 567.

13. CLEGG , J.S. et EVANS, D.R. -
J. Exptl. Biol., 1961, 38, 771.

14. CLEMENTS, A.N., PAGE, J., BORCK,K. et VAN OOYEN, A.J.J. -
J. Insect. Physiol., 1970, 16, 1389.

15. COURTOIS, J.E. -
in GIRARD, M.L., ed. Problèmes actuels de Biochimie Appliquée, 2ème série, p. 107- , Masson ed, Paris 1968.

16. COURTOIS, J.E. -
Rev. Portugese Farm., 1971, à l'impression.

17. COURTOIS, J.E., CHERON, J.M. et DEMELIER, J.F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 1279.

18. COURTOIS, J.E., DEBRIS, M.M. et GEORGET, J.C. -
Bull. Acad. Nat. Med., 1962, 146, 599.

19. COURTOIS, J.E. et DEMELIER, J.F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 277.

20. COURTOIS, J.E., DEMELIER, J.F., LABAT, J. et BARK , C. -
C. R. Soc. Biol., 1969, 163, 2092.

21. COURTOIS, J.E., DEMELIER, J.F., LABAT, J. et HARGREAVES, F.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 1291.

22. COURTOIS, J.E., GEORGET, J.C. et DEMELIER, J.F. -
C. R. Soc. Biol., 1966, 160, 534.

23. COURTOIS, J.E. et PERCHERON, F. -
La Pharmacie Hospitalière Française, 1970, N°14,
4ème trimestre.

24. COURTOIS, J.E., PETEK, F. et KOLAHI-ZANOUZI, M.A. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 735.

25. CRANE, R.K. -
Phys. Rev., 1960, 40, 789.

26. CRITZ, J.B. -
Dissertation Abst., 1962, 22, 852.

27. DAHLQVIST, A. -
Acta. Chem. Scand., 1960, 14, 9.

28. DAHLQVIST, A. et BRUN, A. -
J. Histochem. Cytochem., 1962, 10, 294.

29. DEBRIS, M.M., COURTOIS, J.E. et PETEK, F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 291.

30. DEMELIER, J.F. -
Th. Doct. Etat. Pharm., Paris, 1970.

31. DEMELIER, J.F., BARK, C., LABAT, J. et COURTOIS, J.E. -
in Clinical Enzymology, 1970, 2, 187.

32. DEMELIER, J.F. et COURTOIS, J.E. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2553.

33. DEMELIER, J.F., MASSARI, M. et COURTOIS, J.E. -
C. R. Soc. Biol., 1969, 163, 2094.

34. DEMELIER, J.F., MASSARI, M., COURTOIS, J.E. et LABAT, J. -
Clin. Chim. Acta, 1971, 35, 335.

35. DEMELIER, J.F., SACHS, C. et COURTOIS, J.E. -
C. R. Soc. Biol., 1968, 162. 1924.

36. DENIS, W. et AYER, J.B. -
Arch. Internat. Med., 1920, 26, 436.

37. DERR, R.F. et RANDALL, D.D. -
J. Insect. Physiol., 1966, 12, 1105.

38. EDEWARD, J.T. -
Chem. Ind., 1955, 1102.

39. EZE, L.C. et PRICE EVANS, D.A. -
Clin. Chim. Acta, 1970, 28, 153.

40. EZE, L.C., TWEEDIE, M.C.K. et PRICE EVANS, D.A. -
J. Med. Genet., 1970, 7, 5.

41. GAEBUS, J., HIGERMAN, B. et ALTLAND, P. -
Amer. J. Physiol., 1964, 207, 467.

42. GELLER, S. -
A B C de statistique à l'usage des étudiants en médecine et en biologie. Massor Cie, Editeurs, Paris, 1967.

43. GEORGET, J.Cl. -
Th. Doct. Univ. Pharm., Paris, 1967.

44. GILBY, A.R., WYATT, S.S. et WYATT, G.R. -
Acta. Biochim. Pol., 1967, 14, 83.

45. GUILLOUX, E. -
Th. Doct. Sci., Orsay, 1968.

46. GUILLOUX, E., ARCILA, M.A., COURTOIS, J.E. et MOUMRIKOFF, V. -
Biochimie, 1971, 53, 853.

47. GUILLOUX, E., COURTOIS, J.E. et PERCHERON, F. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 1915.

48. GUILLOUX, E., DEFAYE, J., BELL, R.H. et HORTON, D. -
Carbohydrate Res. 1971, 20, 421.

49. GUSSIN, A.E. et Mc CORMARCH, J.H. -
Plant. Physiol., 1969, 44, 1163.

50. GUSSEN, A.E. et WYATT, G.R. -
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112, 626.

51. HOFSTEE, B.H.J. -
Science, 1952, 116, 329.

52. HULTMAN, E. -
Nature, 1959, 183, 108.

53. HYVÄRINEN, A. et NIKKILÄ, A.E. -
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 140.

54. KRUGER, J. et HESS, B. -
Archiv. F. Mikrobiol., 1968, 61, 154.

55. LABAT, J., DEMELIER, J.F. et COURTOIS, J.E. -
Chemické Zvesti, 1969, 23, 776.

56. LABAT, J., DEMELIER, J.F. et COURTOIS, J.E. -
Abstr. 6th Meeting F.E.B.S. Madrid, 1969, p 288.

57. LINEWEAVER, H. et BURK, D.J. -
J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, 658.

58. LUKOMSKAJA, I.S. et TARASOVA, G.I. -
Biokhimija, 1965, 30, 95.

59. MAC ILVAINE, T.C. -
J. Biol. Chem., 1921, 49, 183.

60. MALATHI, P. et CRANE, R.K. -
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 163, 275.

61. MASSARI, M. -
Th. Doct. Univ. U.E.R. de Biologie, Paris-V, 1971.

62. MICHAELIS, L. -
Biochem. Z., 1931, 234, 139.

63. MICHAELIS, L. et MENTEN, M.L. -
Biochem. Z., 1913, 49, 333.

64. MYRBACK, K. -
Ergebn. Enzym. forsch., 1949, 10, 168.

65. NELSON, N. -
J. Biol. Chem., 1944, 153, 375.

66. NOVOSADOVA, J. -
in POORTMANS, J.R., ed. Biochemistry of exercise, Proceedings of the 1st Int. Symp. on exercise Biochemistry, Brussels, 1968, Karger ed. Basel, 1969, p 254.

67. OESCH, F. et MEIER, H. -
Phytochem., 1967, 6, 1147.

68. OVEREND, W.G., REES, C.W. et SEQUEIRA, J.S. -
J. Chem. Soc., 1962, 3429.

69. PAGET, M. et LAFFORGUE, C. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1942, 24, 1101.

70. PAOLAGGI, F. -
in GIRARD, M.L., ed. problèmes actuels de Biochimie Appliquée, 1ère série p 209-260, Masson ed, Paris, 1967.

71. PAULSEN, R. -
Arch. Biochem. Biophys., 1971, 142, 170.

72. PLUMEL, M. -
Bull. Soc. Chim. Biol., 1948, 30, 129.

73. POORTMANS, J.R. et JEANLOZ, R.W. -
Medicine and Science in Sports, 1969, 1, 57.

74. PSCHEIDT, G.R., BERLET, H.H., SPAIDE, J. et HIMWICH, A.H. -
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 228.

75. ROBINSON, D., PRICE, R.G. et DANCE, N. -
Biochem. J., 1967, 102, 525.

76. SACKTOR, B. -

Proceed. Nat. Acad. Sci., 1968, 60, 1007.

77. SACKTOR, B. et BERGER, S.J. -

Biochem. Biophys. Res Comm 1969, 35, 796.

78. SANGSTER, J.F. et BEATON, J.R. -

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 122, 542.

79. SCHMIDT, E. et SCHMIDT, F.W. -

in POORTMANS, J.R., ed. Biochemistry of exercise, Prodeedings of the 1st Int. Symp. on exercise Biochemistry, Brussels, 1968, Kanger ed. Basel, 1969, p 259.

80. SCHTEINGART, D.E. et CONN, J.W. -

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 131, 388.

81. SEMENZA, G. et RIHOVA, L. -

Biochim. Biophys. Acta, 1969, 178, 393.

82. SEQUEIRA, J.S. -

Ph. D. Thesis, London, 1960.

83. SOMOGYI, M. -

J. Biol. Chem., 1945, 160, 69.

84. TARASOVA, G.I. et LUKOMSKAJA, I.S. -

Biokhimija, 1968, 33, 1264.

85. TARASOVA, G.I. et LUKOMSKAJA, I.S. -

Biokhimija, 1970, 35, 109.

86. VAN HANDEL, E. -

Comp. Biochem. Physiol., 1968, 26, 516.

87. VAN HANDEL, E. -
Science, 1969, 163, 1075.

88. VAN HANDEL, E. -
Clin. Chim. Acta, 1970, 29, 349.

89. VESTERGAARD, P. et LEVERETT, R. -
J. Lab. Clin. Med., 1958, 51, 211.

90. WERNER, M., HEILBRON, D.C., MARUHN, D. et ATOBA, M. -
Clin. Chim. Acta., 1970, 29, 437.

91. WERNER, M., MARUHN, D. et ATOBA, M. -
J. Chromatography, 1969, 40, 254.

92. WYATT, G.R. et KALF, G.F. -
Fed. Proc., 1956, 15, 388.

93. WYATT, G.R. et KALF, G.F. -
J. Gen. Physiol., 1957, 40, 833.

- ° -

T A B L E D E S M A T I E R E S

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

	Pages
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE - GENERALITES	3
CHAPITRE I - REPARTITION ET PRINCIPAUX CARACTERES DES TREHALASES	3
CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES	9
Dosage du glucose libéré lors de l'hydrolyse du tréhalose par la méthode à l'O-toluidine	9
Dosage du glucose par la méthode de NELSON-SOMOGYI	11
Dosage de la créatinine urinaire ...	15
Dosage des protéines urinaires	17
Calculs statistiques	17
DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES TREHALASES DU SERUM ET L'URINE DE L'HOMME	20
CHAPITRE I - ETUDE DE LA CINETIQUE DE LA REACTION	20
A) TREHALASE SERIQUE	20
Détermination du pH optimum	20
Inactivation thermique	22
Détermination de la constante de MICHAELIS	24
Hydrolyse du substrat en fonction du temps	30

Pages

B) TREHALASE URINAIRE 33

Détermination du pH optimum 33

Inactivation Thermique 35

Détermination de la constante de MICHAELIS 36

Hydrolyse du substrat en fonction du temps 37

C) DEFINITION DU PROTOCOLE OPERATOIRE 41

D) CONDITIONS DU PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS 44

CHAPITRE II - INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LES VALEURS DE LA TREHALASEMIE ET DE LA TREHALASURIE 50

A) PRECISION DE LA METHODE 50

B) RESULTATS 51

. Sérums 55

Influence de l'appartenance à des groupes sanguins différents 55

Influence de la race 57

Influence de la présence éventuelle dans le sérum d'inhibiteurs de la tréhalase 62

. Urines 63

Variations circadiennes 65

Influence du sexe 66

. Influence de l'effort 68

. La clearance rénale 75

. Elimination urinaire de la tréhalase chez les sujets diabétiques 78

Pages

CHAPITRE III - ACTION DE DIVERS EFFECTEURS DES TREHALASES SERIQUE ET URINAIRE DE L'HOMME 80

Inhibition par le saccharose 81

Inhibition par le phloridzoside ... 84

Inhibition par différents hétérosides 87

DISCUSSION GENERALE 92

CONCLUSIONS 105

BIBLIOGRAPHIE 108

TABLE DES MATIERES 117